

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLAUDIA DA SILVEIRA

AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA E CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DE EXTRATOS
DE POLPA DO FRUTO DE *Ilex paraguariensis* (ERVA-MATE)

CURITIBA

2020

ANA CLAUDIA DA SILVEIRA

AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA E CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DE EXTRATOS
DE POLPA DO FRUTO DE *Ilex paraguariensis* (ERVA-MATE)

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzarotto

CURITIBA

2020

Silveira, Ana Claudia da

Avaliação da alelopatia e caracterização térmica de extratos de polpa do fruto de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) [recurso eletrônico] / Ana Claudia da Silveira – Curitiba, 2019.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2019.

Orientador: Professor Dr. Marcelo Lazzarotto

1. *Ilex paraguariensis*. 2. Bioherbicida . 3. Antioxidante. 4. Saponinas.
5. Espectrometria de massas. I. Lazzarotto, Marcelo. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 583.271

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANA CLAUDIA DA SILVEIRA**, intitulada: **AVALIAÇÃO DA ALELOPATIA E CARACTERIZAÇÃO TÉRMICA DE EXTRATOS DE POLPA DO FRUTO DE ILEX PARAGUARIENSIS (ERVA-MATE)**, sob orientação do Prof. Dr. MARCELO LAZZAROTTO, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de Mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 17 de Fevereiro de 2020.

MARCELO LAZZAROTTO
Presidente da Banca Examinadora

EGON SCHNITZLER
Avaliador Externo

SAMANTA DALIANA GOLIN PACHECO
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Mara e Aroldo, pelo suporte, carinho e educação que me proporcionaram sem medir esforços.

Ao meu amor, Pedro, pelo apoio incondicional, conforto e carinho.

Ao meu orientador, Professor Marcelo Lazzarotto pela motivação e confiança.

À Professora Elisa Serra Negra Vieira pelo auxílio nas análises de Alelopatia e à Caroline de Bastos Bühner e Adilson Tomaschitz do Laboratório de Sementes da Embrapa Florestas.

À Rachel Cruz Domahovski e Yasmine Sayuri Kassuia pelo apoio nas análises de composição dos extratos e pela companhia durante seu período de estágio na Embrapa.

À Dayane Andrade, Simone Aparecida Sopchaki e Tielidy Angelina de Moraes Lima, pelo auxílio e prontidão sempre que necessário.

Aos meus amigos e família, pelo apoio, conforto e incentivo.

RESUMO

Em 2018 foram colhidas aproximadamente 347 toneladas de folhas de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) no Sul do Brasil. A legislação brasileira determina que a erva-mate beneficiada seja constituída exclusivamente de folhas e ramos, portanto o fruto é considerado um subproduto. No entanto, uma árvore pode produzir 150 kg de folhas para 20 kg de frutos por ano. O cultivo dessa espécie junto a outras, num sistema de consórcio, é utilizado para melhorar o rendimento e recuperar solos marginais. Por isso a importância de estudar sua influência sobre o desenvolvimento de outras plantas. O extrato do fruto da erva-mate apresentou, dentre outras atividades: potencial alelopático sobre o desenvolvimento das raízes de milho. Foi observado alto teor de saponinas, polifenóis e metilxantinas na sua composição, classes de metabólitos secundários que apresentam atividade alelopática. Portanto, o objetivo desse trabalho foi de avaliar potencial bioherbicida e sua relação com a composição de extratos da polpa de frutos de *I. paraguariensis* utilizando análise de atividade antioxidante, saponinas por índice afrosimétrico e caracterização térmica por termogravimetria e calorimetria diferencial simultâneas acopladas à espectrometria de massas (TGA-DSC-MS). Primeiramente, foi realizada otimização do processo de extração avaliando temperatura, sendo escolhidas: 55 °C, indicada para extração de saponinas e 85 °C, cujo extrato apresentou maior atividade antioxidante. A extração total e fracionada obtida por Soxhlet proporcionou extratos de diferentes composições, o que pôde ser avaliado nos resultados de TGA-DSC-MS. A fração etanólica apresentou maior concentração de compostos mais resistentes a degradação térmica e exibiu a maior complexidade de composição, sendo a única a apresentar compostos voláteis. Compostos inorgânicos foram obtidos apenas no extrato aquoso (20% de cinzas totais). Esse extrato foi o de menor complexidade e seu único evento de perda de massa foi relacionado principalmente a liberação de C₅H₄, observado durante a oxidação de compostos como benzeno e tolueno. A atividade alelopática dos extratos aquosos de 55 °C e 85 °C foi testada sobre sementes de cebola (*A. cepa*), alface (*L. sativa*) e picão-preto (*B. pilosa*). A germinação de todas as espécies foi inibida pelos extratos quando avaliadas pelas regras para análises de sementes (RAS) do Ministério da Agricultura, além disso, o extrato de 55 °C foi mais efetivo contra o picão-preto. Utilizando as diretrizes para teste de produtos químicos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), observou-se que os extratos não apresentaram efeito sobre a germinação de cebola e alface e inibiram de forma similar a germinação do picão-preto. Os extratos causaram anormalidades e inibição do crescimento da parte aérea de todas as espécies testadas, sendo esse efeito mais acentuado para o extrato de 55 °C sobre alface e picão-preto. Foi observado que a aplicação do extrato da polpa do fruto da erva-mate como bioherbicida é promissora. Estudos prospectivos são necessários para que o potencial alelopático seja relacionado a compostos específicos e para que esse subproduto seja aplicado de forma sustentável. Além disso, testes de germinação e emergência em solo estão em desenvolvimento para avaliar a relação do grau de anormalidade das plântulas com o seu potencial de desenvolvimento.

Palavras-chave: Bioherbicida. Atividade Antioxidante. Saponinas. TGA-DSC-MS.

ABSTRACT

In 2018 Southern Brazil produced approximately 347 tons of *Ilex paraguariensis* (yerba mate) leaves. Brazilian law defines that commercial yerba mate has to be composed of leaves and branches exclusively, therefore, the fruit is considered a byproduct. However, one tree can produce approximately 150 kg of leaves and 20 kg of fruits per year. This species is often cultivated with other plants in an intercropping system to improve the yield and recover marginal soils. Therefore, it is important to study the influence of this species on others. Moreover, yerba mate fruit extract showed, among other activities: allelopathic potential on corn roots development. High concentration of saponins, polyphenols and methylxantines were found in fruit extract composition. These metabolites have shown allelopathic activity. Therefore, the aim of this study was to evaluate bioherbicide potential of *Ilex paraguariensis* pulp fruit extracts in relation to its composition using antioxidant activity analysis, saponins using foam index analysis and thermal characterization using simultaneous thermogravimetry and differential calorimetry coupled to mass spectrometry (TGA-DSC-MS). Primarily, an exploratory analysis on extraction temperature was carried: the temperature of 55 °C was chosen because it is indicated for saponin extraction and 85 °C was chosen because the extract obtained at this temperature showed the highest antioxidant activity. Total and fractioned extraction obtained by Soxhlet provided different composition extracts, which was evaluated using TGA-DSC-MS. Ethanolic fraction showed the largest concentration of more thermal stable compounds, furthermore, it exhibited the greatest composition complexity. It also showed volatile compounds. Inorganic compounds were only present in aqueous extract, that showed 20% of ashes. This extract showed the minor complexity and its single mass loss event was mainly related to C₅H₄ fragment mass release, which is observed during oxidation of benzene and toluene. The allelopathic activity analyzes of 55 °C and 85 °C aqueous extracts were carried on onion (*A. cepa*), lettuce (*L. sativa*) and black-jack (*B. pilosa*) seeds. All species germination was inhibited by the extracts when the evaluation was carried using Brazilian Agriculture Ministry rules for seeds analyzes (RSA), furthermore, 55 °C extract was more effective against the black-jack. Using the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) guidelines for the testing of chemicals, it was observed that the extracts did not show effect on onion and lettuce germination, therefore, they inhibited black-jack germination similarly. The extracts caused abnormalities and inhibited aerial part growth of all tested species, in addition, the 55 °C extract showed a greater effect on lettuce and black-jack compared to the other extract. The application of yerba mate fruit pulp extracts as a bioherbicide is promising. Prospective studies are necessary to establish a relation between the allelopathic activity and specific compounds of the extract and for the sustainable application of this byproduct. Furthermore, soil germination and emergence tests are being developed to evaluate the degree of relationship between plants abnormalities and their development potential.

Key-words: Bioherbicide. Antioxidant Activity. Saponins. TGA-DSC-MS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ÁRVORE DE <i>Ilex paraguariensis</i> (ERVA-MATE)	16
FIGURA 2 – FOLHA DA ERVA-MATE.....	17
FIGURA 3 - FRUTOS SEMI-MADUROS DA ERVA-MATE	22
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA DE ILEXOSÍDEO II	22
FIGURA 5 – EQUIPAMENTO EXTRATOR DE SOXHLET	27
FIGURA 6 – EQUIPAMENTO DE TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA SIMULTÂNEAS ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (TGA-DSC-MS).....	31
FIGURA 7 – PLÂNTULA DE ALFACE (<i>L. sativa</i>).....	32
FIGURA 8 – PLÂNTULA DE CEBOLA (<i>A. cepa</i>).....	33
FIGURA 9 – PLÂNTULA DE PICÃO-PRETO (<i>B. pilosa</i>).....	34
FIGURA 10 - PREPARAÇÃO DE CAIXA DE GERMINAÇÃO COM SEMENTES DE CEBOLA (<i>A. CEPA</i>).....	44
FIGURA 11 – SEMENTES DO FRUTO DA ERVA-MATE APÓS SEPARAÇÃO DA POLPA	47
FIGURA 12 – PÓ DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE APÓS SEPARAÇÃO DA SEMENTE.....	47
FIGURA 13 – CURVAS DE TGA, DSC E CONTAGEM TOTAL DOS ÍONS DE 18 Da, 28 Da E 44 Da EM ATMOSFERA DE AR DOS EXTRATOS FRACIONADOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE OBTIDOS POR SOXHLET UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES: ÉTER ETÍLICO (E1), ACETATO DE ETILA (E2), ETANOL (E3) E ÁGUA (E4)	56
FIGURA 14 - CURVAS DE TGA, DSC E CONTAGEM TOTAL DO ÍON DE 64 Da EM ATMOSFERA DE AR DOS EXTRATOS FRACIONADOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE OBTIDOS POR SOXHLET UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES: ÉTER ETÍLICO (E1), ACETATO DE ETILA (E2), ETANOL (E3) E ÁGUA (E4)	57
FIGURA 15 – ANORMALIDADES DAS PLÂNTULAS DE CEBOLA (<i>A. cepa</i>) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA- MATE DURANTE GERMINAÇÃO: a) EXTRATO DE 55 °C; b) EXTRATO DE 85 °C; c) PLÂNTULAS CONSIDERADAS NORMAIS...	61

FIGURA 16 – ANORMALIDADES DAS PLÂNTULAS DE ALFACE (<i>L. sativa</i>) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE DURANTE GERMINAÇÃO: a) EXTRATO DE 55 °C; b) EXTRATO DE 85 °C; c) PLÂNTULAS CONSIDERADAS NORMAIS...	62
FIGURA 17 – ANORMALIDADES DAS PLÂNTULAS DE PICÃO-PRETO (<i>B. pilosa</i>) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE DURANTE GERMINAÇÃO: a) EXTRATO DE 55 °C; b) EXTRATO DE 85 °C; c) PLÂNTULA CONSIDERADA NORMAL	63
FIGURA 18 – PLÂNTULAS DE CEBOLA (<i>A. cepa</i>) APÓS TRATAMENTO DURANTE GERMINAÇÃO UTILIZANDO EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE: a) GRUPO CONTROLE; b) EXTRATO DE 55 °C; c) EXTRATO DE 85 °C	67
FIGURA 19 – PLÂNTULAS DE ALFACE (<i>L. sativa</i>) APÓS TRATAMENTO DURANTE GERMINAÇÃO UTILIZANDO EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE: a) GRUPO CONTROLE; b) EXTRATO DE 55 °C; c) EXTRATO DE 85 °C	67
FIGURA 20 – PLÂNTULAS DE PICÃO-PRETO (<i>B. pilosa</i>) APÓS TRATAMENTO DURANTE GERMINAÇÃO UTILIZANDO EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE: a) GRUPO CONTROLE; b) EXTRATO DE 55 °C; c) EXTRATO DE 85 °C	68

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS METABOLOMICAS DE 4 GRUPOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ilex</i>	19
TABELA 2 – DENSIDADE RELATIVA DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE	49
TABELA 3 – RESÍDUO SECO DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE	49
TABELA 4 – CINZAS TOTAIS DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE	50
TABELA 5 – ÍNDICE AFROSIMÉTRICO DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE	50
TABELA 6 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE	51
TABELA 7 – DADOS DE TGA E DSC EM ATMOSFERA DE AR DOS EXTRATOS FRACIONADOS POR SOXHLET DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE, UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES: ÉTER ETÍLICO (E1), ACETATO DE ETILA (E2), ETANOL (E3) E ÁGUA (E4)	58
TABELA 8 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CEBOLA (<i>A. cepa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO RAS	61
TABELA 9 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE (<i>L. sativa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO RAS	63
TABELA 10 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PICÃO-PRETO (<i>B. pilosa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO RAS	64
TABELA 11 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CEBOLA (<i>A. cepa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO OCDE	64
TABELA 12 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE (<i>L. sativa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO OCDE	65

TABELA 13 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PICÃO- PRETO (<i>B. pilosa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO OCDE	65
TABELA 14 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO/ESTÍMULO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE CEBOLA (<i>A. cepa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE	66
TABELA 15 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO/ESTÍMULO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE ALFACE (<i>L. sativa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE	67
TABELA 16 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO/ESTÍMULO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE PICÃO-PRETO (<i>B. pilosa</i>) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE	68

LISTA DE SIGLAS

AMPK – *5' Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase*

APO B- 100 – Apolipoproteína B 100

CA – Concentração de Antioxidantes

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DSC – Calorimetria Diferencial Exploratória

HDL – Lipoproteína de Alta Densidade

HDL-C – Colesterol ligado à Lipoproteína de Alta Densidade

IA – Índice Afrosimétrico

IC₅₀ – Concentração Inibitória Média

II/IE – Índice de Inibição/ Índice de Estímulo

LDL – Lipoproteína de Baixa Densidade

LDL-C – Colesterol ligado à Lipoproteína de Baixa Densidade

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

OCDE – Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PNAPO – Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica

PNILPF – Política Nacional de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta

RAS – Regras para Análise de Sementes

TEAC – Atividade Oxi-redox expressa em equivalente Trolox

TGA – Análise Termogravimétrica

TGA-DSC-MS – Termogravimétrica e Calorimetria Diferencial Simultâneas
Acopladas a Espectrometria de Massas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	14
1.1.1	Objetivo Geral.....	14
1.1.2	Objetivos Específicos	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	ERVA-MATE.....	16
2.1.1	Gênero <i>Ilex</i>	18
2.1.2	Composição do extrato das folhas da erva-mate	19
2.1.3	Atividades biológicas do extratos das folhas da erva-mate	20
2.1.4	Frutos da erva-mate	21
2.2	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	24
2.2.1	Extração por Soxhlet	26
2.3	ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS	28
2.3.1	Análise de perda por dessecação	28
2.3.2	Análise de cinzas totais	28
2.3.3	Resíduo seco.....	28
2.3.4	Densidade relativa.....	29
2.3.5	Índice afrosimétrico	29
2.3.6	Atividade antioxidante	30
2.4	ANÁLISES TÉRMICAS	30
	FONTE: A AUTORA (2019).	31
2.5	ATIVIDADE ALELOPÁTICA.....	31
2.5.1	Regras para análise de sementes (RAS).....	34
2.5.2	Diretrizes para teste de produtos químicos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE)	35
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	FLUXOGRAMA	36
3.2	MATERIAL.....	37
3.2.1	Obtenção do material vegetal	37
3.2.2	Obtenção dos extratos aquosos por maceração para otimização do processo de extração avaliando temperatura.....	37

3.2.3	Obtenção dos extratos aquosos de 55 °C e 85 °C por maceração para caracterização e análise de atividade alelopática	37
3.2.4	Obtenção de extratos fracionados utilizando Soxhlet para caracterização térmica.....	38
3.3	MÉTODOS	38
3.3.1	Análises do pó da polpa do fruto da erva-mate	38
3.3.2	Análises de caracterização dos extratos aquosos obtidos por maceração ...	39
3.3.3	Caracterização dos extratos fracionados obtidos por Soxhlet.....	43
3.3.4	Análise de atividade alelopática dos extratos aquosos obtidos por maceração.....	44
3.3.5	Análise estatística.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1	ANÁLISES DO PÓ DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE.....	47
4.1.1	Porcentagem de polpa obtida em relação ao fruto seco	47
4.1.2	Perda por dessecação	48
4.1.3	Cinzas totais	48
4.2	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO AVALIANDO TEMPERATURA AQUOSA POR MACERAÇÃO	48
4.2.1	Caracterização dos extratos aquosos obtidos por maceração nas temperaturas de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C	48
4.2.2	Escolha das temperaturas de extração.....	52
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS OBTIDOS A 55 °C E 85 °C A PARTIR DA PROGÊNIE PGFB (HFC10164).....	52
4.3.1	Densidade relativa.....	52
4.3.2	Resíduo seco.....	53
4.3.3	Cinzas totais	53
4.3.4	Índice afrosimétrico	53
4.3.5	Atividade antioxidante	54
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS FRACIONADOS OBTIDOS POR SOXHLET.....	54
4.4.1	Rendimento de extração	54
4.4.2	Caracterização térmica dos extratos.....	54
4.5	ANÁLISE DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS AQUOSOS OBTIDOS A 55 °C E 85 °C A PARTIR DA PROGÊNIE PGFB (HFC10164).....	60

4.5.1	Avaliação da porcentagem de germinação pelo método RAS	60
4.5.2	Avaliação da porcentagem de germinação pelo método OCDE	64
4.5.3	Avaliação do índice de inibição/estímulo da parte aérea	66
5	CONCLUSÃO	75
	REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

A polpa do fruto de *Ilex paraguariensis* St. Hil. (Aquifoliaceae) (erva-mate) é considerada um subproduto do cultivo da espécie. A região Sul do Brasil colhe aproximadamente 347 toneladas por ano de folhas da planta (BRASIL, 2018). As folhas são tradicionalmente consumidas como bebida quente (chimarrão), fria (tererê) ou na forma de chá, a partir das folhas tostadas no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (BARBOSA et al., 2015; TURNER et al., 2011). O cultivo da erva-mate junto a outras espécies num sistema de consórcio é utilizado para melhorar o rendimento das culturas e para recuperação de solos marginais, portanto, estuda-se sua influência sobre o desenvolvimento de outras plantas (BRESSAN et al., 2016). Miró, Ferreira e Alquila (1998) observaram que as raízes e os pêlos absorventes de plantas de milho apresentaram menor crescimento quando submetidas a presença do extrato dos frutos de erva-mate.

Observou-se alto teor de saponinas na composição do fruto, as quais diferem das encontradas nas folhas da erva-mate (BORRÉ et al., 2010; TAKETA, BREITMAIER, SCHENKEL, 2004). Além disso, os frutos apresentam polifenóis, antocianinas e metilxantinas (FERNANDES et al., 2017). A cafeína, metilxantina também presente na erva-mate, apresentou efeito alelopático sobre a planta medicinal *Borreria hispida* L. e sobre espécies de cafeeiros. (ROSA et al., 2006; TANTI et al., 2016). Dentre os metabólitos encontrados no fruto, as saponinas podem inibir a germinação, agindo na membrana da semente por sua característica surfactante, promovendo diminuição da difusão de oxigênio para o embrião (MARCHAIM, WERKER, THOMAS, 1974). Além disso, os polifenóis também são estudados por sua atividade alelopática (POPA et al., 2008).

Considerando a toxicidade de herbicidas sintéticos comumente utilizados (MESNAGE et al., 2015; RELYEA, 2005), busca-se alternativas de menor toxicidade agregando valor a um resíduo de cultivo, a polpa do fruto da erva-mate. Dessa forma, o desenvolvimento desse trabalho se baseia nas diretrizes e objetivos das Políticas Nacionais de Agroecologia e Produção Orgânica (PNAPO) e de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta (PNILPF). Sendo que dentre as diretrizes da PNAPO, destaca-se o incentivo à produção de alimentos orgânicos isentos de aditivos de potencial risco a saúde e à produção sustentável, utilizando dentre seus instrumentos a pesquisa científica e tecnológica (BRASIL, 2012). E dentre os

objetivos da PNILPF destacam-se o incentivo à pesquisa e desenvolvimento tecnológico para integração ecológica e econômica da agricultura, floresta e pecuária e a promoção da diversificação de renda ao produtor rural com incentivo a sustentabilidade do agronegócio e preservação ambiental (BRASIL, 2013).

Portanto, propõe-se a avaliação do potencial bioherbicida do extrato da polpa de frutos da erva-mate sobre a germinação e desenvolvimento primário de sementes e plântulas de alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e picão-preto (*Bidens pilosa*), bem como a relação dessa atividade com os constituintes desse extrato a partir da sua composição e comportamento térmico.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar potencial bioherbicida e sua relação com a composição de extratos da polpa de frutos de *Ilex paraguariensis* (erva-mate) utilizando análise de atividade antioxidante, saponinas por índice afrosimétrico e caracterização térmica por termogravimetria e calorimetria diferencial simultâneas acopladas à espectrometria de massas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Coletar frutos semi-maduros da erva-mate, secá-los em estufa e separar a polpa da semente, identificar a espécie e produzir exsicata para depositar em herbário.
- Determinar a relação de polpa com a massa de fruto seco e a caracterizar utilizando análise de perda por dessecação (teor de umidade) e cinzas.
- Definir melhor temperatura de extração da polpa do fruto por meio de ensaios preliminares.
- Adaptar método de análise do índice afrosimétrico para a polpa do fruto da erva-mate.
- Adaptar método de análise de atividade antioxidante para a polpa do fruto da erva-mate.

- Caracterizar extratos da polpa de material genético conhecido nas temperaturas de extração escolhidas.
- Caracterizar e comparar composição de extratos fracionados da polpa do fruto de material genético conhecido obtidos por Soxhlet utilizando Análise Termogravimétrica e Calorimetria Exploratória Diferencial Simultâneas Acopladas a Espectrometria de Massas (TGA-DSC-MS).
- Determinar a atividade alelopática dos extratos de material genético conhecido obtidos nas temperaturas escolhidas utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*), cebola (*Allium cepa*) e picão-preto (*Bidens pilosa*).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ERVA-MATE

Ilex paraguariensis, conhecida popularmente por erva-mate, é uma árvore tropical da América Latina, da família Aquifoliaceae, produtora de flor e fruto (FIGURA 1). É uma espécie forestal umbrófila (de sombra) que cresce espontaneamente em matas de *Araucaria angustifolia*. Foi classificada por August de Saint Hilaire, botânico francês em 1822 (MAZUCHOWSKI, 1989).

FIGURA 1 – ÁRVORE DE *Ilex paraguariensis* (ERVA-MATE)



FONTE: A autora (2018).

As folhas da erva-mate medem de 8 a 10 cm de comprimento e 4 a 5 cm de largura, sendo que têm a base mais estreita e pecíolo de aproximadamente 15 mm. Elas são alternas, subcoriáceas ou coriáceas e as bordas levemente dentadas (FIGURA 2) (MAZUCHOWSKI, 1989). São tradicionalmente cultivadas para consumo na forma de bebida quente (chimarrão), fria (tererê) ou em forma de chá, a partir das folhas tostadas, no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (BARBOSA et

al., 2015; TURNER et al., 2011). Existem indícios de que os povos indígenas sulamericanos já utilizavam a erva-mate muito antes de conhecer sua composição. Os jesuítas inseriram o cultivo sistemático, a colheita das sementes e a produção de mudas no cultivo da espécie, além disso eles otimizaram e expandiram o preparo da bebida para países europeus (MAZUCHOWSKI, 1989).

FIGURA 2 – FOLHA DA ERVA-MATE



FONTE: A autora (2018).

A erva-mate processada geralmente é obtida de folhas de diversos produtores que organizam uma cooperativa (BASTOS et al., 2006). O processamento da planta para obtenção da erva para chimarrão pode ser dividido em três fases principais: sapeco (secagem rápida), feito para reduzir a quantidade de água e inibir atividade enzimática; secagem, que pode ser realizada em secadores mecânicos; e moagem, também chamada de cancheamento (ESMELINDRO et al., 2002). Este processamento das folhas confere maiores concentrações de compostos ativos como cafeína, teobromina, rutina e derivados de caffeoil (ISOLABELLA et al., 2010). A erva-mate tostada, consumida popularmente na forma de chá, é obtida submetendo o material vegetal a temperaturas entre 250 °C e 550 °C por dois a quatro minutos (TURNER et al., 2011).

Somente a região Sul do Brasil produz aproximadamente 347 toneladas por ano de folhas de erva-mate, sendo que o Paraná é o estado que mais produz, contemplando 86,39%, seguido de Santa Catarina, com 8,32% e Rio Grande do Sul com 5,24% (BRASIL, 2018). Como recurso para aumentar o rendimento e recuperar os solos marginais, a erva-mate pode ser cultivada junto a outras espécies num sistema de consórcio, portanto, estuda-se sua influência sobre o desenvolvimento de outras plantas (BRESSAN et al., 2016). A legislação para erva-mate beneficiada

determina que essa deve ser constituída exclusivamente de folhas e ramos (BRASIL, 2005). No entanto, uma árvore adulta pode produzir aproximadamente 20 kg de frutos e 150 kg de folhas por ano, sendo o fruto considerado um subproduto do cultivo da espécie (FERNANDES et al., 2016).

2.1.1 Gênero *Ilex*

O gênero *Ilex* contempla mais de 400 espécies, sendo sua maior variedade encontrada no leste da Ásia e na América do Sul (MANEN, BOULTER, NACIRI-GRAVEN, 2002). Filip et al. (2001) investigaram as concentrações de flavonoides e ácidos fenólicos nos extratos aquosos de 7 espécies do gênero *Ilex*. Nesse estudo foi observado que *I. paraguariensis* apresenta a maior concentração de ambos grupos de metabólitos comparada as demais. Além disso, *I. paraguariensis* apresentou maior concentração de cafeína e teobromina (1,922% e 484% com relação à massa de folha seca, respectivamente). Traços de cafeína foram encontrados nos extratos das espécies *I. theezans*, *I. dumosa*, *I. pseudobuxus* e *I. microdonta*, sendo que com exceção da última espécie, todas as demais apresentaram traços de teofilina. Traços de teobromina foram encontrados em *I. argentina* e *I. microdonta* (FILIP et al., 1998).

Cardozo et al. (2007) analisaram a concentração de cafeína, teobromina, ácido clorogênico e cafeico nas folhas de 16 progenies de *Ilex paraguariensis*. As progênies de diferentes origens e cultivadas em diferentes localizações apresentaram diferenças significativas na concentração das metilxantinas. Assim como, as progênies provenientes de diferentes locais de cultivo apresentaram diferenças significativas de fenóis totais e ácidos cafeico e clorogênico.

Kim et al. (2010) realizaram análise metabolômica de 11 espécies do gênero *Ilex* utilizando ressonância nuclear magnética. Assim, obtiveram a possibilidade de classificação das espécies em 4 grupos, conforme a (TABELA 1).

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS METABOLÓMICAS DE 4 GRUPOS DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Ilex*

Grupo	Características	Espécies
A	Alta concentração de xantinas e compostos fenólicos que incluem fenilpropanoides e flavonoides	<i>I. paraguariensis</i>
B	Saponinas de uma porção de ácido oleanólico	<i>I. dumosa</i> var. <i>dumosa</i> e <i>I. dumosa</i> var. <i>guaranina</i>
C	Arbutina e fenilpropanoides, especialmente ácido dicafeoilquínico	<i>I. integerrima</i> , <i>I. pseudobuxus</i> e <i>I. theezans</i>
D	Maior concentração de saponinas ursanicas	<i>I. argentina</i> , <i>I. brevicuspis</i> , <i>I. microdonta</i> e <i>I. taubertiana</i>

FONTE: KIM et al. (2010).

2.1.2 Composição do extrato das folhas da erva-mate

Os compostos encontrados em diferentes espécies do gênero *Ilex* pertencem aos grupos de metabólitos secundários: xantinas (teobromina, cafeína e teofilina) (POMILIO, TRAJTEMBERG, VITALE, 2002), fenóis, ácidos fenólicos, fenilpropanoides, antocianinas, flavonóis e flavonas, terpenóides, esteróis, alcaloides purínicos, aminoácidos, ácidos graxos (no óleo extraído da semente), carboidratos, vitaminas, carotenoides (ALIKARIDIS, 1987) e minerais (BARBOSA et al., 2015).

Diversos estudos contemplam o estudo das saponinas de espécies do gênero *Ilex* da América do Sul, especialmente a respeito da identificação e isolamento das matesaponinas da erva-mate (GOSMANN, SCHENKEL, SELIGNMANN, 1989; GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996). Dentre as saponinas da espécie, as mais abundantes são derivadas triterpenoides não-iônicas do ácido oleanólico e ácido ursólico, que podem apresentar uma ou duas cadeias de açúcar (KRAEMER et al., 1996; TAKETA, BREITMAIER, SCHENKEL, 2004). Gosmann, Schenkel e Selignmann (1989) isolaram e identificaram os primeiros compostos glicosilados da erva-mate, dentre eles, a matesaponina 1 e suas pró-sapogeninas. Outros estudos reportaram a identificação de outras matesaponinas (GOSMANN et al., 1995; KRAEMER et al., 1996). Clifford e Ramirez-Martinez (1990) isolaram ácido 3-cafeoilquínico e 3,5-ácido dicafeoilquínico de *Ilex paraguariensis*.

A região geográfica e o macro clima do cultivo desempenham significativa influência na variabilidade da concentração dos compostos da erva-mate (CANSIAN et al., 2008). O período do ano também pode influenciar a composição do extrato. Foi observado, por exemplo, que em fevereiro a concentração de metilxantinas da *Ilex paraguariensis* é maior quando comparada ao mês de outubro. Nesse mesmo

estudo observou-se que quanto maior a intensidade luminosa no cultivo, menor a concentração de metilxantinas (COELHO, 2002). Coelho (2002) destacou grande variação intra-populacional nas concentrações de matesaponina 1, 2 e 3, além de reduzido teor de cafeína em amostras com alto teor de matesaponina 1. Diferentes metodologias aplicadas a extração de diferentes genótipos da planta apresentaram variação na composição. O extrato das folhas por spray-dryer, por exemplo, apresentou alto teor de ácido cafeico, ácido 5-cafeoilquínico e rutina (BERTÉ et al., 2011).

2.1.3 Atividades biológicas do extratos das folhas da erva-mate

Estudos a respeito do extrato das folhas da erva-mate constataram atividade antioxidante (FILIP et al., 2000) e bactericida contra *S. aureus* e *E. coli* (BURRIS et al., 2011), sendo que os compostos responsáveis por essas atividades mostraram-se resistentes a processos industriais. *Ilex paraguariensis* apresentou a maior atividade antioxidante quando comparada a outras espécies do mesmo gênero. Os compostos que podem estar relacionados a essa característica são os derivados de cafeína e as formas livre e glicosilada da rutina, quercetina e caemferol (FILIP et al., 2000).

Além disso, foi observada atividade citotóxica do extrato frente a células tumorais hepáticas in vitro (RAMIREZ-MARES, CHANDRA, MEJIA, 2004) e ação inibidora da progressão de arteriosclerose, inclusive diminuindo a taxa de colesterol sérico em coelhos (MOSIMANN et al., 2006). Ainda sobre o efeito do extrato sobre perfil lipídico de organismos, observou-se ação redutora dos níveis de LDL, colesterol não HDL, APO B-100, e razão LDL-C/HDL-C, além do aumento do HDL (MORAIS, et al., 2009). Outros estudos apontaram efeito protetor do extrato da erva-mate na obesidade induzida por dieta rica em gordura, havendo aumento da oxidação de ácidos graxos via fosforilação da AMPK no tecido adiposo visceral (PANG, CHOI, PARK, 2008). Pedroso et al. (2010) indicaram as saponinas presentes no extrato como compostos possivelmente relacionados a diminuição do colesterol total e quantidade de gordura abdominal em estudos com animais. O ácido ursólico, presente na erva-mate, apresenta atividade de auxiliar no aumento da massa muscular e melhoramento da obesidade (KATASHIMA et al., 2017; TAKETA, BREITMAIER, SCHENKEL, 2004).

Müller et al. (2007) observaram atividade antiviral da erva-mate contra vírus herpes simplex tipo 1, sendo possivelmente associada a presença do ácido cafeoilquínico, seus derivados e as saponinas triterpenoides. Outro estudo verificou atividade antibacteriana do extrato contra *Propionibacterium acnes* (TSAI et al., 2010). Além de apresentar atividades de interesse, o extrato das folhas comerciais da planta não demonstraram ação citotóxica ou citostática (ALVES et al., 2008).

Outra atividade encontrada para o extrato aquoso de *I. paraguariensis* é atividade colerética, que embasa o uso popular da infusão com propósito digestivo e hepatoprotetor (GORZALCZANY et al., 2001). Além disso, o extrato da planta apresentou atividade alelopática sobre sementes germinadas de trigo, estimulando o crescimento das raízes (GONZÁLEZ et al., 1993); atividade anti-trombótica (GUGLIUCCI; MENINI, 2002) e vasorelaxante endotélio-dependente in vitro, mediada por NO-cGMP ou AMP (BAISCH, URBAN, RUIZ, 2004).

2.1.4 Frutos da erva-mate

Os frutos de *Ilex paraguariensis* são drupóides, globosos, de superfície lisa e lustrosa, medem aproximadamente 6 a 8 mm e apresentam coloração violácea a quase preta quando maduros. São tetraspérmicos, tetraloculares, de endocarpo ósseo-lenhoso e mesocarpo carnosos. São compostos por quatro sementes envolvidas por uma polpa mucilagenosa (KUNIYOSHI, 1983; MAZUCHOWSKI, 1989).

Uma árvore adulta pode produzir aproximadamente 20 kg de frutos por ano (FERNANDES et al., 2016). Sendo que o período de frutificação da espécie geralmente se dá com início em dezembro e janeiro e final da maturação entre março e maio. Nesse período observa-se a mudança de coloração dos frutos junto ao seu aumento de massa e diâmetro (BRITO et al., 2018). No entanto, o processo de maturação não ocorre de forma homogênea, ou seja, num mesmo período podem ser encontrados frutos verdes, em processo de maturação (vermelhos) e maduros (violáceos) (FIGURA 3). A maturação varia entre indivíduos, de ano para ano e de acordo com as condições ambientais. Para obtenção das sementes para cultivo de novos indivíduos, os frutos são colhidos durante maturação avançada, quando apresentam coloração violácea e escura (ZANON, 1988). No entanto, em observações de campo realizadas pela Embrapa Florestas concluiu-se que o estágio

de maturação de maior período de disponibilidade para coleta, portanto mais abundante, é o semi-maduro (vermelho).

FIGURA 3 - FRUTOS SEMI-MADUROS DA ERVA-MATE

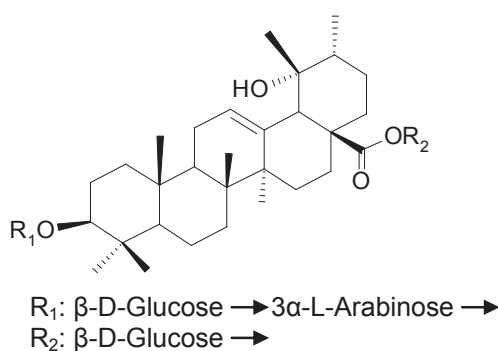


FONTE: Décio Adams Júnior (2018).

2.1.4.1 Composição do extrato dos frutos

Os frutos de *I. paraguariensis* apresentam alto teor de saponinas (PAVEI et al., 2007). As saponinas identificadas no fruto são diferentes das encontradas nas folhas da planta. Um dos principais e primeiramente identificados compostos desse grupo foi denominado ilexosídeo II (FIGURA 4) (TAKETA, BREITMAIER, SCHENKEL, 2004). Outro grupo de metabólitos secundários encontrados em grande quantidade é o de metilxantinas. Fernandes et al. (2016) constataram a cafeína como componente majoritário no extrato de frutos obtido por propano pressurizado e CO₂ supercrítico.

FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA MOLÉCULA DE ILEXOSÍDEO II



FONTE: A autora (2020).

Em estudo em que os frutos maduros foram utilizados para preparação de extratos por maceração utilizando etanol contendo 0,1% HCl e etanol 70% (v/v), obteve-se maior atividade antioxidante usando solvente acidificado, provavelmente porque o conteúdo de compostos fenólicos totais desse extrato foi maior quando comparado ao hidroalcoólico. No mesmo estudo observou-se inibição da atividade da maltose e redução do colesterol total e triglicerídeos quando o extrato acidificado foi testado em ratos Wistar machos (FERNANDES et al., 2017).

Quando comparados as folhas, os frutos apresentam diferente valor nutricional e solubilidade dos seus elementos em água quente. Eles apresentam maior concentração de potássio, e em contrapartida, menor concentração de nitrogênio, magnésio, manganês, cálcio, ferro, alumínio e outros elementos. Porém, elementos do fruto como o ferro, cálcio, zinco, alumínio, chumbo e outros apresentaram maior solubilidade em água quente quando comparados aos das folhas. Quanto a segurança alimentar dos frutos, os mesmos não apresentam grande quantidade de elementos que reduzam a segurança do seu consumo (BARBOSA et al., 2015).

2.1.4.2 Atividades biológicas do extrato dos frutos

Brito, Gosmann e Oliveira (2018) testaram a atividade molusquicida do extrato butanólico dos frutos de *I. paraguariensis* e obtiveram resultados promissores para o controle de *P. canaliculata*, molusco aquático e importante praga no cultivo do arroz. Miró, Ferreira, Alquila (1998) analisaram a atividade alelopática do extrato dos frutos de erva-mate frente a germinação e desenvolvimento de plantas de *Zea mays* (Milho) em laboratório. Também avaliaram atividade alelopática dos frutos maduros de erva-mate sobre o crescimento de plantas de milho em casa de vegetação. A partir dessas análises, concluíram que as raízes e os pêlos absorventes de *Zea mays* sofrem influência do extrato, apresentando menor crescimento. No entanto, a germinação e emergência das plantas não sofreu influência do extrato ou dos frutos maduros da erva-mate.

Em análise de irritação primária dérmica pelo teste de Draize, foram utilizados: o extrato bruto dos frutos imaturos da erva-mate, uma fração desse extrato e um extrato bruto purificado rico em saponinas. As amostras não

apresentaram interação cutânea, pois não geraram grau significativo de eritema, crosta ou edema nos animais (CANTO, 2007).

Treter et al. (2010) obtiveram uma fração saponosídica do extrato dos frutos imaturos da erva-mate obtida por extração em fase sólida utilizando gradiente de solvente metanol:água. Foi testado seu potencial contra *Trichomonas vaginalis* e obteve-se atividade moderada na concentração de 0,06% em peso. Também foi observada ausência de citotoxicidade em células renais bovinas na mesma concentração. Peixoto (2009) testou atividade hemolítica da fração saponosídica do extrato dos frutos imaturos obtida por extração em fase sólida utilizando gradiente de concentração dos solventes metanol e água. Foi obtido IC₅₀ de 0,25 g/L espresso em ilexosídeo II, indicando baixa toxicidade.

Fernandes et al. (2016) obtiveram extratos dos frutos maduros a partir de extrações por fluido pressurizado utilizando CO₂ supercrítico e propano comprimido. Os extratos foram testados quanto a atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). Quanto a atividade antimicrobiana, o extrato obtido por propano comprimido apresentou atividade fraca contra as duas cepas. Enquanto o extrato obtido por CO₂ supercrítico apresentou atividade fraca contra *S. aureus* e atividade moderada contra *E. coli*. O extrato obtido por CO₂ supercrítico apresentou maior inibição do radical DPPH (17,77%), provavelmente atribuído a maior concentração de teobromina e cafeína, (porquê apresenta maior afinidade para os compostos polares) quando comparado ao obtido por propano comprimido (11,27% de inibição do radical).

2.2 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Dentre os parâmetros que influenciam a composição do extrato, destacam-se o tempo, temperatura, tamanho de partícula e líquido extrator (SHARMA et al., 2014; WOLFF; SILVEIRA; LAZZAROTTO, 2019; SARI; VELIOGLU, 2011). Quanto ao tamanho da partícula da matriz vegetal, partículas de menor tamanho proporcionam extração mais eficiente para diversos compostos, exceto quando o tamanho muito reduzido provoca aglomeração, dificultando o contato do solvente com a matriz vegetal (GIÃO et al., 2009; SARI; VELIOGLU, 2011).

Por sua vez, o tempo de extração deve ser suficiente para permitir a saturação da solução, garantindo maior rendimento. Porém, ele não pode ser longo o suficiente para favorecer alterações químicas indesejáveis. Da mesma forma, o uso de temperatura muito elevada pode aumentar a degradação, no entanto, o aumento da mesma favorece a solubilidade de diversos compostos (SHARMA et al., 2014; WOLFF; SILVEIRA; LAZZAROTTO, 2019). Tabaraki, Heidarizadi e Benvidi (2012) observaram que temperaturas de 52 °C - 67 °C podem aumentar a porosidade da parede celular na matriz vegetal, melhorando a permeabilidade ao solvente e consequentemente a eficiência da extração. Em trabalho desenvolvido com o objetivo de testar diferentes métodos de extração aplicados as folhas da erva-mate, foi observado que as combinações de tempo e temperatura mais elevados (85 °C por 10 min e 100 °C por 40 min), assim como o uso de solvente hidroalcoólico, proporcionaram melhor rendimento de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (WOLFF; SILVEIRA; LAZZAROTTO, 2019).

Segundo Oleszek e Bialy (2006), quando o objetivo da extração é obter a real composição de saponinas de uma matriz vegetal, indica-se o uso de solvente hidroalcoólico a frio. Além disso, os metabólitos secundários majoritários dos frutos da erva-mate apresentam boa solubilidade em solventes hidroalcoólicos, devido a sua afinidade por compostos polares (TAKETA, BREITMAIER, SCHENKEL, 2004; FERNANDES et al., 2017). Inclusive, de forma geral, metabólitos secundários apresentam boa solubilidade em misturas etanólicas, no entanto, na escolha do solvente, a toxicidade do mesmo deve ser levada em conta de acordo com a possível aplicação do extrato (SIMÕES et al., 2000, p. 167).

Diferentes métodos de extração podem ser utilizados para obtenção de extratos dos frutos da erva-mate na tentativa de evitar o uso de solventes orgânicos e sua toxicidade. Diferentes resultados de rendimento, custo, e concentração de metilxantinas foram observados para extratos dos frutos obtidos com CO₂ supercrítico e propano pressurizado (FERNANDES et al., 2016). A polaridade e pH dos solventes utilizados apresentam importante influência na composição dos extratos. Diferenças de composição foram observadas para extratos hidroalcoólico e hidroalcoólico acidificado (FERNANDES et al., 2017). Silva et al. (2016) compararam a concentração de saponinas dos extratos obtidos por extração por campo elétrico moderado, extração assistida por ultrassom e extração líquida pressurizada dos frutos imaturos da erva-mate. A extração assistida por ultrassom se mostrou mais

eficiente comparada a extração por campo elétrico moderado. No entanto, o uso de etanol e dióxido de carbono pressurizado na temperatura de 50 °C foi o método mais eficiente dentre os testados, sendo inclusive mais fácil a separação do soluto e solvente nesse caso.

Os trabalhos previamente citados a respeito da extração de compostos de frutos da erva-mate não descrevem testes de temperaturas acima de 55 °C. Na literatura não são encontrados trabalhos que discutam a temperatura de extração dos frutos de *I. paraguariensis*. No entanto, sabe-se que saponinas são compostos termicamente estáveis e que os compostos fenólicos e antioxidantes das folhas da espécie foram extraídos com melhor rendimento utilizando temperaturas de 85 °C e 100 °C (CHÁVEZ-SANTOSCOY et al., 2016; SILVA et al., 2016; WOLFF; SILVEIRA; LAZZAROTTO, 2019).

2.2.1 Extração por Soxhlet

Soxhlet é um equipamento desenvolvido por von Soxhlet em 1879. Sua montagem é realizada conforme a (FIGURA 5), em que a amostra é inserida em suporte fechado e poroso dentro do extrator, que por sua vez é encaixado em um frasco de destilação (como um balão de vidro de fundo redondo) sobre uma fonte de calor. Dessa forma, o solvente (também chamado de líquido extrator) inserido no frasco de destilação entra em ebulição e volatiliza. A parte superior do extrator é encaixada em um condensador, onde o solvente condensa ao entrar em contato com resfriamento e quando seu volume dentro do extrator atinge um limite, o sifão permite seu esvaziamento para o frasco de destilação. Portanto, ciclos de volatilização e condensação permitem que o solvente entre em contato com a amostra por diversas vezes (CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010).

FIGURA 5 – EQUIPAMENTO EXTRATOR DE SOXHLET



FONTE: A autora (2019).

A extração por soxhlet é utilizada quando se faz uso de solvente volátil, uma vez que consiste de um sistema fechado e evita a perda por volatilização. Além disso, comparado a outros métodos, emprega uma quantidade menor de solvente numa extração eficiente (SIMÕES et al., 2000, p. 168).

Para casos em que a composição da amostra não é conhecida, pode-se obter uma extração fracionada utilizando solventes de polaridade crescente. Nesse caso, nas frações de menor polaridade (éter etílico, éter de petróleo, hexano, etc) são extraídos preferencialmente pigmentos, alcaloides livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos, ceras, geninas de antraquinonas, etc. Na fração acetato de etila ou n-butanol são extraídas algumas cumarinas e flavonoides, enquanto em etanol extraem-se heterosídeos de diversos metabólitos e na fração aquosa saponinas e taninos (SIMÕES et al., 2000, p. 166). O emprego do gradiente de polaridade de solventes utilizando soxhlet é utilizado com o objetivo de obter uma extração total e fracionada do material vegetal (LOVAGLIO et al., 2017).

2.3 ENSAIOS DE CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS VEGETAIS

2.3.1 Análise de perda por dessecação

A quantidade de água é um fator importante para estabilidade de drogas vegetais. O processo de secagem reduz a atividade enzimática e de microorganismos, permitindo maior estabilidade dos compostos secundários da planta (GONDA et al., 2012). A análise de perda por dessecação é realizada para amostras que apresentam substâncias voláteis além de água em sua composição, cuja concentração é determinada na análise. A Farmacopéia Brasileira 6ª edição recomenda o método gravimétrico para a maioria das amostras, sendo em alguns casos aplicado o método termogravimétrico. A gravimetria consiste em determinar a diferença de massa da amostra antes e após dessecação em estufa (%) (BRASIL, 2019).

2.3.2 Análise de cinzas totais

A análise quantitativa de cinzas totais é importante para o controle de qualidade de drogas e alimentos, uma vez que pode ser estabelecido um limite do conteúdo de cinzas esperado para uma amostra. Dessa forma, um conteúdo de cinzas acima do preconizado pode significar adulteração (ARAÚJO et al., 2006; LIU, 2019). Essa é uma análise que permite avaliar o teor de impurezas inorgânicas não voláteis e é realizada levando a amostra a incineração em forno mufla, sendo observado ao final do processo apenas o resíduo de minerais (cinzas) (SIMÕES et al., 2017, p. 93).

A Farmacopeia Brasileira 6ª ed. preconiza uma metodologia para análise de cinzas totais, a qual consiste em obter a massa de cinzas de uma amostra após sua incineração a no máximo 650 °C (BRASIL, 2019).

2.3.3 Resíduo seco

O teor de resíduo seco, ou teor de extrativos de um extrato também é utilizado como uma análise de caracterização. Quando uma amostra é submetida a extração com diferentes solventes, essa análise pode ser empregada para avaliar a

quantidade de compostos extraídos por cada líquido extrator. Dessa forma, o solvente é levado a secar e a massa seca do extrato é obtida (SIMÕES et al., 2017, p. 93)

2.3.4 Densidade relativa

A análise de densidade também é preconizada pela Farmacopeia Brasileira para controle de qualidade de líquidos. Seguindo essa metodologia, deve-se obter a massa de um volume fixo da amostra e a massa do mesmo volume de água na mesma temperatura. Assim, o valor de densidade da amostra é corrigido utilizando o valor teórico de densidade da água naquela temperatura, seguindo a tabela descrita na metodologia, e a densidade experimental da água (BRASIL, 2019).

2.3.5 Índice afrosimétrico

As saponinas são metabólitos secundários heterosídeos, pois apresentam estrutura química que pode ser caracterizada por duas partes: açúcar (hidrossolúvel) e um núcleo esteroidal ou triterpenóide (lipossolúvel). Dessa forma, apresentam característica anfifílica, o que as proporciona a propriedade de formação de espuma estável (SIMÕES et al., 2017, p. 285-286). Essa propriedade possibilita a execução de métodos afrosimétricos de identificação e semi-quantificação desse metabólito em extratos (BRASIL, 2010; YOON; WROLSTAD, 1984). O método semi-quantitativo de análise do índice afrosimétrico ou índice de espuma é rápido e de baixo custo. Ele foi descrito na Farmacopéia Brasileira 5ª ed e 6ª ed. O índice afrosimétrico pode ser definido como o volume de água necessário para diluir 1 g da droga analisada para que se obtenha 1 cm de espuma persistente por 15 minutos após agitação enérgica por 15 segundos (BRASIL, 2010; 2019). O aprimoramento e adaptação desse método farmacopeico aplicado ao extrato da polpa do fruto da erva-mate foi descrito por Kassuia et al. (2019). Esse aprimoramento permite realização do teste semi-quantitativo com obtenção de um resultado mais preciso para que se possa comparar dois extratos diferentes, por exemplo.

2.3.6 Atividade antioxidante

Entre os compostos antioxidantes encontrados em extratos de drogas pode-se citar tocoferóis, carotenoides, vitamina C, cafeína e compostos fenólicos. Dentre os métodos espectrofotométricos utilizados para essa análise, o mais utilizado é o do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), sendo amplamente aplicado a frutos (SUCUPIRA et al., 2012). Essa metodologia foi desenvolvida por Blois em 1958 e é baseada na mudança de coloração (de violeta escuro para amarelo ou violeta claro) e consequente diminuição da absorbância da solução contendo o reagente DPPH e o antioxidante (KEDARE; SINGH, 2011). Silveira et al. (2018) propuseram uma adaptação dessa metodologia para análise da polpa do fruto da erva-mate recomendando menor tempo de reação.

2.4 ANÁLISES TÉRMICAS

As análises térmicas são utilizadas para avaliar o comportamento da amostra submetida a variação de temperatura. Elas podem ser utilizadas para caracterizar drogas vegetais e seus extratos ou no controle de qualidade, pois fornecem informações quanto a estabilidade e podem ser relacionadas a composição da amostra (CORREIA et al., 2013; FERNANDES et al., 2013).

A análise termogravimétrica (TGA) revela a perda de massa em função do tempo ou temperatura, enquanto a Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) apresenta a diferença de temperatura entre a amostra e um material de referência (HAZRA et al., 2004; NUNES et al., 2015). A aplicação do DSC envolve a interpretação dos picos endotérmicos e exotérmicos obtidos na análise, que podem estar relacionados a diversos fenômenos físicos e químicos. Dentre esses fenômenos pode-se citar desidratação, degradação oxidativa, reações de oxidação ou redução, entre outras (IONASHIRO, CAIRES, GOMES, 2014). A espectrometria de massas (MS) permite a identificação dos fragmentos provenientes dos compostos volatilizados durante o aquecimento da amostra (FIGURA 6) (MALUCELLI et al., 2018).

FIGURA 6 – EQUIPAMENTO DE TERMOGRAVIMETRIA E CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA SIMULTÂNEAS ACOPLADO À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (TGA-DSC-MS)



FONTE: A autora (2019).

2.5 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Alelopatia é o efeito que as biomoléculas (aleloquímicos) produzidas por uma planta apresentam sobre outra planta, sendo benéfico ou maléfico. Os aleloquímicos são liberados no ambiente e podem influenciar o crescimento e desenvolvimento de plantas adjacentes (RIZVI, RIZVI, 1992). Muitos estudos comprovam o potencial herbicida de aleloquímicos frente a diferentes espécies-alvo (DUDAI et al., 1999; DUKE et al., 2002; PUTNAM; DUKE, 1974).

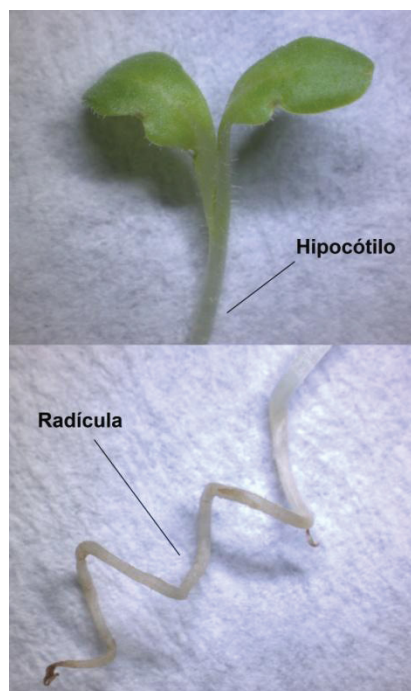
Os mecanismos de ação dos aleloquímicos podem ser classificados como direto e indireto. Aleloquímicos de ação direta apresentam influência no crescimento e metabolismo da planta, atuando sobre a permeabilidade da membrana, fotossíntese, respiração, síntese de moléculas, atividades enzimáticas e outros fatores. Os de ação indireta atuam nas características do solo e nas populações de organismos que apresentam influência sobre a planta (RIZVI, RIZVI, 1992). Mesmo que o mecanismo de ação seja relacionado a uma alteração pontual, os aleloquímicos podem influenciar rotas inteiras, pois o metabolismo das plantas é formado por reações reguladas em série (FERREIRA; AQUILA, 2000).

Os testes de alelopatia avaliam a germinação e crescimento primário de sementes expostas a amostra em placas de petri ou caixas de germinação contendo papel filtro. No geral, os testes de germinação apresentam menor sensibilidade, neles avalia-se o número de sementes que germinaram. Nos testes de crescimento primário, são avaliados fatores como comprimento da raiz primária (radícula) e parte

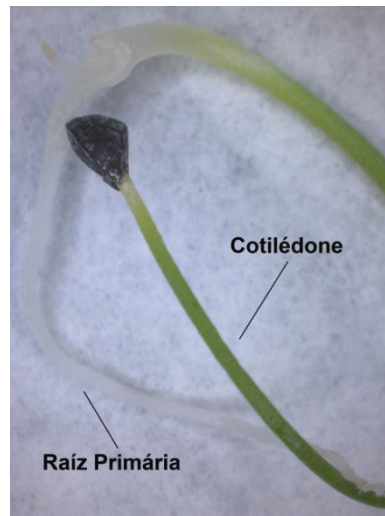
aérea (hipocótilo, cotilédone, epicótilo, etc) (FERREIRA; AQUILA, 2000; BRASIL, 2009).

Macías Catellano e Molinillo (2000) recomendam o uso de espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas nos ensaios de alelopatia. As sementes de alface (*Lactuca sativa*) são frequentemente utilizadas em testes de atividade alelopática pois apresentam germinação rápida e alta sensibilidade a aleloquímicos. Portanto, essa espécie pode ser escolhida dentre as espécies de dicotiledôneas, (FIGURA 7). Dentre as espécies de monocotiledôneas, a cebola (*Allium cepa*) pode ser utilizada em ensaios de alelopatia, (FIGURA 8).

FIGURA 7 – PLÂNTULA DE ALFACE (*L. sativa*)

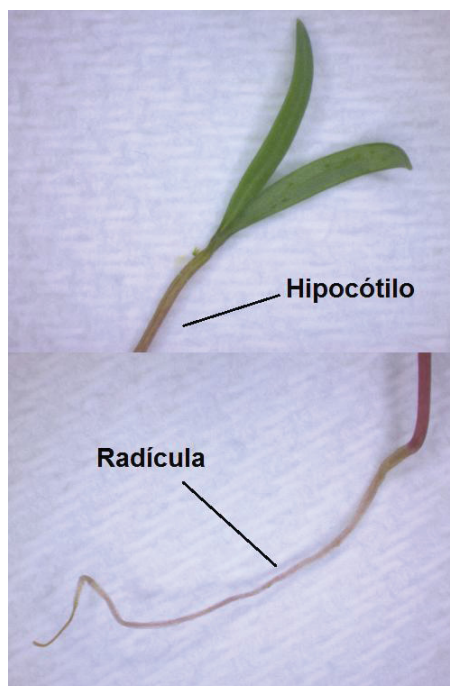


FONTE: A autora (2019).

FIGURA 8 – PLÂNTULA DE CEBOLA (*A. cepa*)

FONTE: A autora (2019).

Bidens pilosa (picão-preto) é uma dicotiledônea da família Asteraceae, considerada planta daninha agressiva, pois apresenta atividade fitotóxica, ampla disseminação e resistência a diferentes temperaturas, uma vez que é encontrada em culturas agrícolas de regiões tropicais e subtropicais, especialmente no Centro-Sul do Brasil em todas as épocas do ano (FIGURA 9). Autores encontraram mutações genéticas nessa espécie que conferiram resistência a herbicidas como o glifosato, paraquat, nicosulfuron, imazaquin, imazetapir, piritiobaque sódico, clorimuron etílico e atrazina. *B. pilosa* é encontrada em culturas de limão, soja, milho, café, etc. (SANTOS; CURY, 2011; CRUZ et al., 2016; HEAP, 2019).

FIGURA 9 – PLÂNTULA DE PICÃO-PRETO (*B. pilosa*)

2.5.1 Regras para análise de sementes (RAS)

As Regras para Análise de Sementes (RAS) do Ministério da Agricultura têm como objetivo descrever metodologias direcionadas aos laboratórios que avaliam qualidade das sementes produzidas, comercializadas e utilizadas no Brasil. A aplicação dessas regras é obrigatória nos laboratórios de análises de sementes credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), como é o caso do laboratório de sementes da Embrapa Florestas (BRASIL, 2003; BRASIL, 2009).

Dentre as análises descritas na RAS está o teste de germinação, que permite a comparação do potencial máximo de germinação entre diferentes lotes, possibilitando avaliar a qualidade e valor da semeadura do lote. Para tanto, a observação da germinação leva em conta a emergência e desenvolvimento das estruturas da semente germinada e também a sua capacidade de produzir uma planta considerada normal. Dessa forma, as RAS descrevem características que devem ser observadas para que se considere a normalidade de cada indivíduo. Dentre as características descritas para plântulas anormais destacam-se a presença de estruturas essenciais muito danificadas, deformadas ou deterioradas, não havendo desenvolvimento proporcional. Portanto, uma plântula pode ser

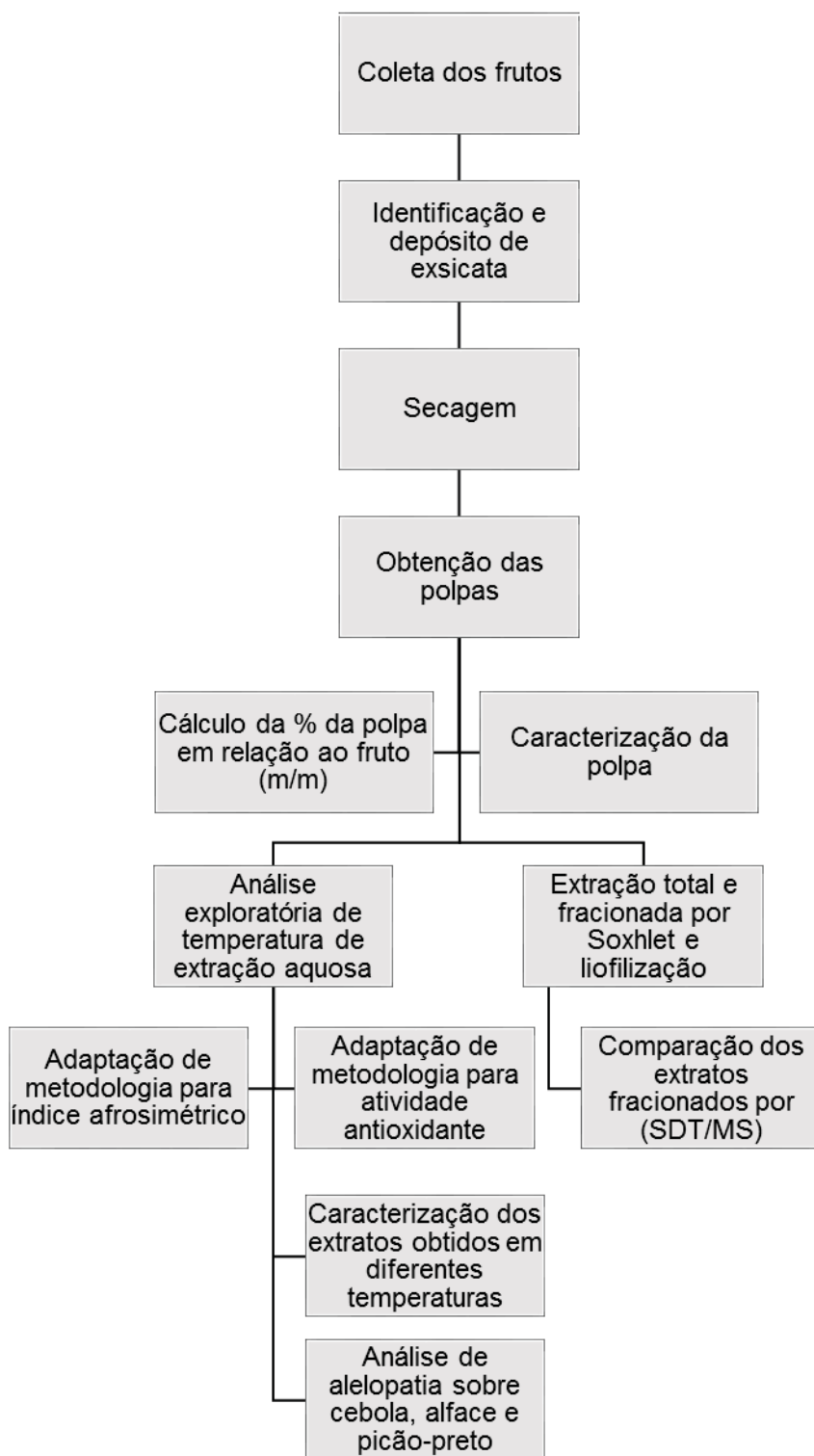
considerada anormal, e por isso não conta dentre as germinadas, quando apresenta por exemplo, raiz primária atrofiada, curta e grossa, fina e fraca ou desproporcional as demais estruturas (BRASIL, 2009).

2.5.2 Diretrizes para teste de produtos químicos da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE)

As diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico para teste de emergência e crescimento de plântulas são aplicáveis para análise de produtos químicos em geral, pesticidas e biocidas. Essa metodologia não leva em conta os efeitos crônicos dessas substâncias sobre a planta, porém, encoraja a descrição do percentual de injúria observado nas plântulas tratadas com o composto químico, comparadas as plântulas do grupo controle, como necrose, deformação, etc. Para fins dessas diretrizes, fitotoxicidade se refere aos desvios de aparência e crescimento de uma plântula tratada com uma substância quando essa é comparada a uma plântula de padrão normal, através de medidas e alterações visuais (vigor, malformação, necrose, capacidade de sustentar-se e clorose). Dessa forma, consideram-se germinadas aquelas sementes que apresentaram emergência, ou seja, aparecimento do cotilédono (OCDE, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FLUXOGRAMA



3.2 MATERIAL

3.2.1 Obtenção do material vegetal

Os frutos da erva-mate foram coletados na Embrapa de Ponta Grossa-PR (coordenadas: 25° 9.500'S, 50° 4.400'O) no período de maturação, em março de 2018. Material de diferentes progênies foi obtido para otimização do processo de extração avaliando temperatura. Para as demais análises, foi coletado material de progênie específica, cuja excicata foi depositada no Herbário da Embrapa Florestas, em Colombo-PR, sob a seguinte identificação e número de registro: PGFB (HFC10164). Os frutos foram secos em estufa modelo 315 SE (FANEM®) (40 °C por 24 horas) e triturados utilizando liquidificador doméstico de 1.000 W Mondial® Turbo Inox, sendo utilizado um tempo de 30 segundos de trituração para aproximadamente 10 g de fruto seco. O pó das polpas foi separado das sementes utilizando tamis de 18 mesh e um pincel para reduzir perdas.

3.2.2 Obtenção dos extratos aquosos por maceração para otimização do processo de extração avaliando temperatura

O pó da polpa (3,0000 g \pm 0,0011 g) de frutos secos de diferentes progênies de erva-mate foi submetido a extração por maceração à quente utilizando múltiplo aquecedor de 527 W de potência, modelo SP-10203/A (SPLabor®) nas temperaturas de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C com variação de no máximo 5 °C por 15 minutos. Foi utilizado 100 mL de água destilada tipo II (3% m/V). Cada extrato foi obtido em duplicata. Os extratos foram filtrados e seus volumes completados utilizando balão volumétrico.

3.2.3 Obtenção dos extratos aquosos de 55 °C e 85 °C por maceração para caracterização e análise de atividade alelopática

A partir do pó da polpa dos frutos secos da progênie PGFB (HFC10164) foram preparados extratos aquosos por maceração a quente em múltiplo aquecedor utilizando 9,0000 g \pm 0,0005 das polpas para 300 mL de água tipo II (3% m/V). A

extração foi realizada por 15 minutos e utilizando água tipo II já aquecida nas temperaturas de 55 °C e 85 °C \pm 1 °C. A extração foi realizada em duplicata.

3.2.4 Obtenção de extratos fracionados utilizando Soxhlet para caracterização térmica

Os extratos fracionados foram obtidos a partir de 20,0000 g \pm 0,0009 de polpa da progênie PGFB (HFC10164). A amostra foi acondicionada em um cartucho de papel de filtro colocado no aparelho de Soxhlet. Foram utilizados diferentes solventes em ordem crescente de polaridade: éter etílico, acetato de etila e etanol. Cada extração foi realizada por 4 horas com 200 mL do solvente. Depois da extração etanólica, o conteúdo do cartucho foi colocado em um Ermenleyer para a extração aquosa a 55 °C \pm 5 por 2 horas utilizando múltipli aquecedor. As frações orgânicas foram reduzidas até secura em estufa a 60 °C e a fração aquosa foi liofilizada utilizando liofilizador Bench Top Pro, VirTis SP Scientific®.

3.3 MÉTODOS

3.3.1 Análises do pó da polpa do fruto da erva-mate

O pó da polpa dos frutos secos da progênie PGFB (HFC10164) da erva-mate foi submetido a análises de porcentagem de polpa em relação ao fruto seco, perda por dessecação e cinzas totais.

3.3.1.1 Porcentagem de polpa obtida em relação ao fruto seco

Cinco amostras de 10,0000 \pm 0,021 g de fruto seco inteiro foram pesadas, trituradas e submetidas a separação das polpas e sementes conforme descrito anteriormente. A massa de polpa obtida após tamisação foi comparada a massa de frutos secos utilizada, dessa forma foi calculada a porcentagem de polpa para fruto seco (m/m).

3.3.1.2 Perda por dessecação

A metodologia para análise de perda por dessecação pelo método gravimétrico foi adaptada da Farmacopéia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). Cadinhos de porcelana foram previamente calcinados em forno mufla (Quimis®) até 600 °C por duas horas e então resfriados em dessecador e pesados. Uma amostra de $1,0000 \pm 0,0003$ g da polpa obtida foi adicionada ao cadinho e levada a estufa (aproximadamente 105 °C) por 2 horas. Após esse período, o cadinho com amostra dessecada foi resfriado em dessecador e pesado em balança analítica Shimadzu® AY220. O teste foi realizado em triplicata e a massa do cadinho foi subtraída da massa final para cálculo da porcentagem de perda por dessecação em relação a massa de polpa utilizada (m/m). A amostra proveniente dessa análise foi direcionada para determinação do teor de cinzas totais.

3.3.1.3 Cinzas totais

Essa análise foi realizada com a amostra obtida na determinação da perda por dessecação. Foi adaptada metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). A amostra dessecada foi levada a forno mufla (600 °C) por 2 horas, depois resfriada em dessecador e pesada em balança analítica. O teste foi realizado em triplicata e a porcentagem de cinzas (m/m) foi obtida comparando a massa inicial da amostra (antes da dessecação em estufa) com a massa final mensurada.

3.3.2 Análises de caracterização dos extratos aquosos obtidos por maceração

Para escolha da temperatura de extração para a análise de atividade alelopática do extrato da polpa do fruto da erva-mate, foi realizada otimização do processo de extração avaliando temperatura, utilizando ensaios gerais de caracterização: densidade relativa, resíduo seco e cinzas totais. Também foram aplicados ensaios semi-quantitativo e quantitativo para análise dos principais grupos de metabólitos secundários encontrados no fruto da erva-mate: saponinas (análise do índice afrosimétrico) e antioxidantes - metilxantinas e polifenóis (utilizando

método do DPPH) (FERNANDES et al., 2016; FERNANDES et al., 2017; PAVEI et al., 2007).

3.3.2.1 Densidade relativa dos extratos

A metodologia de análise de densidade relativa dos extratos foi adaptada da Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (BRASIL, 2019). Um volume fixo de 5 mL do extrato foi pesado utilizando balança analítica em triplicata. Também foi obtida a massa de 5 mL de água destilada tipo II na mesma temperatura da amostra. Utilizando o valor de densidade da água estabelecido pela Farmacopéia na temperatura mensurada no momento da análise, foi calculada a densidade relativa, conforme (EQUAÇÃO 1).

$$d_r = \frac{m_{\text{amostra}}}{m_{\text{água}}} \times d_{\text{águatabela}} \quad (1)$$

Em que:

d_r = densidade relativa da amostra.

m_{amostra} = massa experimental de determinado volume da amostra.

$m_{\text{água}}$ = massa experimental de determinado volume de água.

$d_{\text{águatabela}}$ = densidade teórica da água na temperatura mensurada.

3.3.2.2 Resíduo seco

Conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª ed., resíduo seco é a massa obtida após evaporação total do solvente do extrato e dessecação do mesmo em estufa (100 - 105 °C) (BRASIL, 2019). A análise foi realizada em triplicata para cada extração realizada, sendo utilizados 3 mL dos extratos e um cadinho de porcelana previamente calcinado, resfriado em dessecador e pesado. Foi obtida a massa do volume adicionado e posteriormente a amostra foi levada a estufa por 2 horas na temperatura de 105 °C. Posteriormente, o cadinho foi resfriado em dessecador e pesado. Foi obtida porcentagem de perda por dessecação comparando a massa inicial a massa após dessecação (m/m). A amostra proveniente dessa análise foi direcionada para determinação do teor de cinzas totais.

3.3.2.3 Cinzas totais

Essa análise foi realizada utilizando amostra proveniente da determinação de perda por dessecação. A metodologia utilizada foi adaptada da Farmacopéia Brasileira 6ª edição (BRASIL, 2019). A amostra dessecada foi levada ao forno mufla por 2 horas a temperatura de no máximo 600 °C. O cadinho foi então resfriado em dessecador e pesado em balança analítica. O teste foi realizado em triplicata para cada extração realizada e a porcentagem de cinzas obtida comparando a massa inicial da amostra (antes da dessecação em estufa) com a massa das cinzas obtidas (m/m).

3.3.2.4 Índice afrosimétrico

A concentração de saponinas foi obtida pelo método semi-quantitativo adaptado da Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (BRASIL, 2010) e descrito por Kassuia et al. (2019). Os extratos foram diluídos com água tipo II conforme a necessidade para que os tubos de altura de espuma adjacente a 1 cm estivessem entre o 3º e 8º tubos da curva. Nesses casos, a diluição foi considerada no cálculo do índice afrosimétrico. Foi preparada curva de concentração de extrato com 10 tubos contendo de 0,1 a 1,0 mL de extrato, sendo o volume de cada tubo completado para 10 mL com água tipo II. Os tubos foram agitados manualmente e energicamente por 15 segundos e deixados em repouso por 15 minutos. Com auxílio de régua, foram obtidas as alturas de espuma dos 10 tubos. Os valores obtidos para os dois tubos de altura de espuma adjacente a 1 cm foram utilizados para o cálculo do índice afrosimétrico, conforme (EQUAÇÃO 2). Nos casos em que um dos tubos apresentou exatamente 1 cm de espuma, foi utilizada a (EQUAÇÃO 3) para o cálculo do IA. A análise foi realizada em triplicata para cada extração realizada.

$$IA = \frac{1000 \times (a_2 - a_1)}{(1 - a_1) \times (c_2 - c_1) + c_1 \times (a_2 - a_1)} \quad (2)$$

Em que:

c_1 = Concentração de polpa de erva-mate (g.L^{-1}) no tubo com altura de espuma menor do que 1 cm.

c_2 = Concentração de polpa de erva-mate (g.L^{-1}) no tubo com altura de espuma maior do que 1 cm.

a_1 = Altura de espuma (cm) no tubo com altura menor do que 1 cm.

a_2 = Altura de espuma (cm) no tubo com altura maior do que 1 cm.

$$IA = \frac{1000}{c} \quad (3)$$

Em que:

c = Concentração de polpa de erva-mate (g.L^{-1}) no tubo com altura de espuma igual a 1 cm.

3.3.2.5 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi obtida utilizando reagente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) seguindo metodologia adaptada de Blois (1958) (KEDARE; SINGH, 2011) descrita no trabalho Silveira et al. (2018). Para tanto, foi utilizada curva padrão de Trolox[®]. Os extratos foram diluídos conforme necessidade para adequação do resultado à curva padrão, sendo levada em conta essa diluição nos cálculos do resultado. Para execução da reação, 150 μL dos extratos foram adicionados a 5,850 mL da solução de uso de DPPH em tubos de ensaio, a mistura foi homogeneizada e deixada em repouso por 15 minutos. A reação foi desenvolvida na ausência de luz artificial em triplicata. Álcool etílico absoluto foi utilizado como branco e no preparo do tubo de controle negativo, em substituição ao extrato. Após período de repouso, a absorbância dos tubos foi lida em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu[®] 1800, em comprimento de onda de 515 nm. A concentração de antioxidantes (CA) foi calculada a partir da equação da reta da curva padrão e a absorbância das amostras e foi expressa em concentração equivalente de Trolox[®] (μM) (EQUAÇÃO 4).

$$CA = \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - b)}{a} \quad (4)$$

Sendo:

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$ = absorbância da amostra.

a = coeficiente angular da curva de calibração.

b = coeficiente linear da curva de calibração.

A atividade oxi-redox da amostra expressa em equivalente Trolox[®] (μmol/grama de polpa) (TEAC) foi calculada conforme (EQUAÇÃO 5).

$$\text{TEAC} = \text{CA} \times \frac{0,3 \text{ L}}{9 \text{ g}} \quad (5)$$

3.3.3 Caracterização dos extratos fracionados obtidos por Soxhlet

As frações éter etílico, acetato de etila e etanol, obtidas por Soxhlet conforme item 3.2.4, foram levadas a secar em estufa e a fração aquosa foi liofilizada. O rendimento do conteúdo extraído por cada solvente utilizado foi obtido após eliminação do solvente. Posteriormente, as frações foram caracterizadas termicamente utilizando análise TGA-DSC acoplada a espectrometria de massas.

3.3.3.1 Análise de rendimento de extração

Um béquer de 500 mL de capacidade foi levado a estufa por aproximadamente 1 hora, depois resfriado em dessecador e pesado em balança analítica. Após obtenção de cada fração, o conteúdo extraído foi adicionado ao béquer e levado a secar em estufa a 60 °C ou liofilizador. Após total evaporação do solvente, o béquer foi resfriado novamente e pesado, sendo obtida a massa do conteúdo seco extraído. O rendimento (%) foi calculado considerando a massa de polpa utilizada na extração como 100%.

3.3.3.2 Caracterização térmica dos extratos fracionados

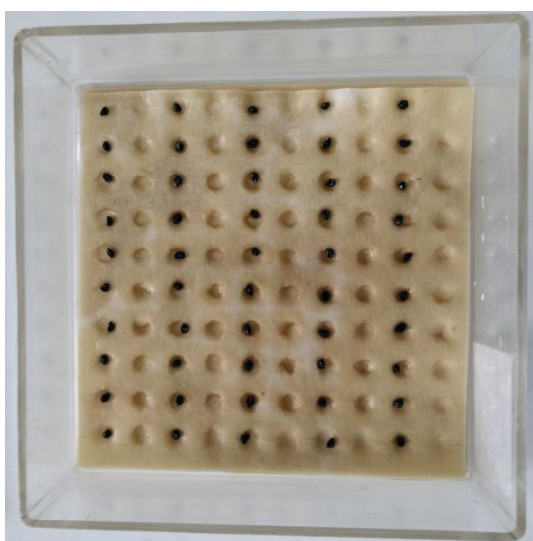
A análise TGA-DSC acoplada a espectrometria de massas foi aplicada para comparar a composição química dos extratos utilizando Analisador Térmico Simultâneo acoplado a Espectrometria de Massas Q600MS (TA Instruments[®], USA). Massa de aproximadamente 1,8 mg de cada extrato foi submetida a aquecimento de 5 °C.min⁻¹ até 600 °C em atmosfera de ar de 50 mL.min⁻¹. As massas de 1 até 150

Da foram mensuradas. As perdas de massa foram obtidas utilizando o *software* TA 60WS (Shimadzu®, Japan) e os gráficos foram plotados utilizando Oringing Pro 8.0 (OriginLab Research®) (MALUCELLI et al., 2018).

3.3.4 Análise de atividade alelopática dos extratos aquosos obtidos por maceração

A atividade alelopática foi realizada utilizando os extratos obtidos em temperatura escolhida pela otimização do processo de extração avaliando temperatura, utilizando polpa dos frutos da progênie PGFB (HFC10164). Os extratos foram testados utilizando sementes de picão preto (*Bidens pilosa* – planta daninha), alface (*Lactuca sativa* - dicotiledônea) e cebola (*Allium cepa* - monocotiledêna). A metodologia utilizada foi adaptada da literatura (BRASIL, 2009; GAALICHE et al., 2017). Duas folhas de papel de filtro foram adicionadas a caixa de germinação e umedecidas com volume de extrato correspondente a aproximadamente 3 vezes o peso dos papéis de filtro utilizados (14 mL). A análise foi realizada em quadruplicata, com 50 sementes em cada repetição, que corresponde a uma caixa de germinação, conforme (FIGURA 10). O controle negativo foi realizado utilizando água tipo II. As caixas foram fechadas, envolvidas em plástico filme e então incubadas em câmara de germinação (20 °C e fotoperíodo de 8/16) por 7 dias para alface e picão-preto, e 11 dias para cebola (BATISH et al., 2002; BRASIL, 2009).

FIGURA 10 - PREPARAÇÃO DE CAIXA DE GERMINAÇÃO COM SEMENTES DE CEBOLA (A. CEPA)



FONTE: A autora (2019).

Após o período de incubação, foram obtidas as contagens de sementes germinadas e de plântulas anormais conforme as metodologias descritas pelas Regras para Análise de Sementes (RAS) e Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (BRASIL, 2009; OCDE, 2006). Dessa forma, foram obtidas as porcentagens de germinação e de plântulas anormais, comparando os valores contabilizados ao total de sementes do mesmo grupo.

3.3.4.1 Avaliação da porcentagem de germinação pelo método RAS

Seguindo as Regras para Análise de Sementes (RAS) do Ministério da Agricultura, foram consideradas sementes germinadas aquelas que aparentam capacidade de produzir uma planta considerada normal. Para tanto, foram consideradas características de normalidade: estruturas essenciais (radícula e parte aérea) bem desenvolvidas, proporcionais e de aparência sadia. Por outro lado, as características consideradas indicativo de anormalidade foram: ausência de alguma das estruturas essenciais ou presença de estrutura essencial danificada, deformada, desproporcional ou deteriorada em função de infecções a ponto de prejudicar desenvolvimento normal da planta. A observação de uma ou mais das seguintes características foi levada em conta para considerar uma plântula anormal: radícula curta e grossa, desproporcional, atrofiada, fina e fraca ou retorcida; parte aérea curta e grossa, retorcida ou curvada (BRASIL, 2009).

3.3.4.2 Avaliação da porcentagem de germinação pelo método OCDE

A porcentagem de germinação também foi avaliada conforme as diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico para teste de emergência e crescimento de plântulas. Foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram aparecimento de cotilédone, ou seja, emergência. Também foi obtido o número de plântulas anormais, que compreendem aquelas que apresentaram diferenças de aspecto quando comparadas as do mesmo grupo. (OCDE, 2006).

3.3.4.3 Avaliação do índice de inibição/estímulo da parte aérea

Foi realizada avaliação de índice de inibição (em caso de resultado negativo) ou estímulo (em caso de resultado positivo) para o crescimento da parte aérea. Para tanto, foram obtidas medidas da parte aérea de 10 plântulas de cada caixa de germinação utilizando paquímetro digital, portanto 40 medidas por tratamento e 40 do grupo controle. Foi calculado o Índice de inibição/estímulo (II/IE) de acordo com a (EQUAÇÃO 6).

$$II/IE = \frac{(t - c)}{c} \times 100 \quad (6)$$

Em que:

t = medida da parte aérea de plântula do grupo tratamento.

c = média das medidas de parte aérea do grupo controle.

3.3.5 Análise estatística

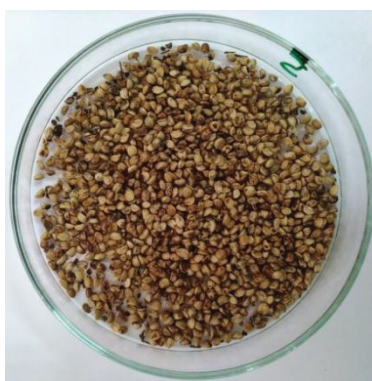
A normalidade dos dados foi testada utilizando teste de Shapiro Wilk por meio do software Past[®] (*Paleontological Statistics software package for education and data analysis*). Os dados que apresentaram distribuição normal (simétrica), conforme a curva de Gauss, foram submetidos ao teste de Tukey com grau de significância de 1% e 5% por meio do software SASM-Agri[®] (Sistema para Análise e Separação de Médias em Experimentos Agrícolas). Os dados que não apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis por meio do software Past[®], uma vez que testes não-paramétricos não dependem da distribuição dos dados, portanto, podem ser usados quando esses não seguem uma distribuição normal (FILHO, 1999; ZAR, 1999).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES DO PÓ DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Após secagem, trituração e tamização dos frutos da erva-mate, o pó da polpa foi separado das sementes, (FIGURAS 11, 12). A partir dessa polpa foram realizadas análises de caracterização: porcentagem de polpa em relação ao fruto seco, perda por dessecação e cinzas totais.

FIGURA 11 – SEMENTES DO FRUTO DA ERVA-MATE APÓS SEPARAÇÃO DA POLPA



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 12 – PÓ DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE APÓS SEPARAÇÃO DA SEMENTE



FONTE: A autora (2019).

4.1.1 Porcentagem de polpa obtida em relação ao fruto seco

Para calcular a porcentagem de polpa em relação a massa de fruto seco, foi obtida a massa de polpa resultante a partir de massa conhecida do fruto. Esse

processo foi realizado em quintuplicata. A média e desvio padrão calculados para esses resultados foram de $28,4029\% \pm 2,9461\%$. Esse resultado sugere uma relação de aproximadamente 1:3 entre polpa e semente dos frutos secos semi-maduros da erva-mate.

4.1.2 Perda por dessecação

A porcentagem de perda por dessecação obtida pela média das triplicatas para essa análise foi de $10,8945\% \pm 0,1579\%$. O teor de umidade máximo preconizado para café, cevada torrados e café solúvel é de 5%. A mesma RDC que determina esses valores também regulamenta parâmetros de qualidade para a folha da erva-mate, porém não descreve limite de umidade para a mesma (BRASIL, 2005).

4.1.3 Cinzas totais

A média e desvio padrão das triplicatas para análise de cinzas totais foram de $6,2021\% \pm 0,0447\%$. Essa análise permite avaliar quantitativamente o conteúdo mineral da amostra, sendo utilizado como parâmetro de qualidade de drogas vegetais e alimentos, pois um conteúdo de compostos inorgânicos muito acima do esperado pode indicar adulteração (ARAÚJO et al., 2006; LIU, 2019). O resultado obtido é similar ao obtido para folhas da erva-mate calculado em base seca (5,58% a 6,13%) (ESMELINDRO et al., 2002).

4.2 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO AVALIANDO TEMPERATURA AQUOSA POR MACERAÇÃO

4.2.1 Caracterização dos extratos aquosos obtidos por maceração nas temperaturas de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C

4.2.1.1 Densidade relativa

A análise de densidade relativa foi realizada em triplicata, os resultados foram apresentados na (TABELA 2).

TABELA 2 – DENSIDADE RELATIVA DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Temperatura de Extração	Densidade Relativa (g.mL ⁻¹)
40 °C	0,9808 ^{aA} ± 0,0036
55 °C	0,9688 ^{bB} ± 0,0041
70 °C	0,9745 ^{abAB} ± 0,0103
85 °C	0,9774 ^{abAB} ± 0,0078

Letras iguais significam que não existe diferença significativa entre os valores na mesma coluna, segundo Teste de Tukey com grau de significância de 1% (letras minúsculas) e 5% (letras maiúsculas).

Os extratos apresentaram diferenças significativas de densidade, o que indica diferente composição. O extrato de 40 °C apresentou a maior densidade relativa, por isso pode apresentar moléculas de maior massa molecular e em maior quantidade. Por outro lado, o extrato de 55 °C apresentou a menor densidade relativa, e os demais apresentaram resultados semelhantes.

4.2.1.2 Resíduo seco

A análise de resíduo seco foi realizada em triplicata, os resultados foram apresentados na (TABELA 3). Os extratos analisados não apresentaram diferença significativa de resultados para essa análise.

TABELA 3 – RESÍDUO SECO DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Temperatura de Extração	Resíduo Seco (%)
40 °C	1,2796 ^{aA} ± 0,0506
55 °C	1,2677 ^{aA} ± 0,0284
70 °C	1,2642 ^{aA} ± 0,0383
85 °C	1,2853 ^{aA} ± 0,0251

Letras iguais significam que não existe diferença significativa entre os valores na mesma coluna, segundo Teste de Tukey com grau de significância de 1% (letras minúsculas) e 5% (letras maiúsculas).

4.2.1.3 Cinzas totais

Os resultados da análise de cinzas totais durante otimização do processo de extração avaliando temperatura foram descritos na (TABELA 4). Não houve diferença significativa dos resultados obtidos para as diferentes temperaturas de extração.

TABELA 4 – CINZAS TOTAIS DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Temperatura de Extração	Cinzas Totais (%)
40 °C	0,0851 ^{aA} ± 0,0169
55 °C	0,0845 ^{aA} ± 0,0510
70 °C	0,0809 ^{aA} ± 0,0212
85 °C	0,0889 ^{aA} ± 0,0231

Letras iguais significam que não existe diferença significativa entre os valores na mesma coluna, segundo Teste de Tukey com grau de significância de 1% (letras minúsculas) e 5% (letras maiúsculas).

4.2.1.4 Índice afrosimétrico

Os extratos de 55 °C, 70 °C e 85 °C foram diluídos na proporção 1:2 para adequação do resultado a curva de formação de espuma e a diluição foi considerada para o cálculo dos resultados (TABELA 5).

TABELA 5 – ÍNDICE AFROSIMÉTRICO DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Temperatura de Extração	Índice Afrosimétrico
40 °C	540,6 ^{bB} ± 92,1
55 °C	4295,6 ^{aA} ± 405,2
70 °C	4000,0 ^{aA} ± 544,3
85 °C	4078,0 ^{aA} ± 457,7

Letras iguais significam que não existe diferença significativa entre os valores na mesma coluna, segundo Teste de Tukey com grau de significância de 1% (letras minúsculas) e 5% (letras maiúsculas).

Os extratos obtidos em diferentes temperaturas apresentaram resultados semelhantes, com exceção do extrato de 40 °C, que apresentou IA significativamente inferior comparado aos demais. Por outro lado não houve diferença significativa quando comparados os extratos de 55 °C, 70 °C e 85 °C utilizando essa metodologia. Silva (2016) observou que a temperatura de 40 °C proporcionou menor rendimento na extração de saponinas dos frutos verdes da erva-mate quando comparada a temperatura de 50 °C utilizando campo elétrico moderado e ultrassom.

Na literatura são descritas metodologias de extração de saponinas por maceração em diferentes temperaturas (entre temperatura ambiente até 80 °C) para variadas aplicações (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014). Para extração desses metabólitos de *Panax notoginseng* utilizando microondas, foram avaliadas temperaturas de 20 °C, 50 °C e 80 °C, sendo observada a maior concentração no

extrato obtido a 50 °C e a possibilidade de degradação desses compostos na temperatura de 80 °C (VONGSANGNAK et al., 2004).

4.2.1.5 Atividade antioxidante

Os resultados do extrato de 70 °C apresentaram-se fora da normalidade quando submetidos ao teste de Shapiro Wilk, por isso foi aplicado teste de Kruskal-Wallis (TABELA 6). Por se tratar de uma análise exploratória para escolha de temperatura de extração, os resultados apresentados foram considerados suficientes para concluir que o extrato de 85 °C apresentou a maior atividade antioxidante.

TABELA 6 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS de 40 °C, 55 °C, 70 °C e 85 °C DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Temperatura de Extração	Atividade Antioxidante (equivalente a μmol de Trolox [®] / g de polpa)
40 °C	10,0649 \pm 0,4284
55 °C	10,3702 \pm 0,9124
70 °C	15,4623 \pm 2,6301
85 °C	27,6446 \pm 0,3539

Segundo teste de Kruskal-Wallis existe diferença significativa entre os extratos.

Schubert et al. (2007) observaram que os polifenóis dos extratos de frutos da erva-mate são diretamente relacionados ao seu potencial antioxidante testado pelo método do DPPH. Portanto, a temperatura de 85 °C proporcionou maior concentração de compostos com atividade antioxidante, e provavelmente maior concentração de compostos fenólicos, conforme também observado por Wolff, Silveira e Lazzarotto (2019) para os extratos das folhas. Nesse mesmo trabalho foram obtidos valores de atividade antioxidante superiores para as folhas da erva-mate (9.664,75 \pm 279,94 a 13.236,02 \pm 339,42 $\mu\text{mol TE.L}^{-1}$). O resultado obtido para extração da polpa do fruto na temperatura de 40 °C foi superior ao obtido em estudo anterior, em que se utilizou a mesma metodologia porém polpa de fruto de material genético diferente. Nesse estudo o resultado foi de 5,46 \pm 0,90 μmol de Trolox[®] / g de polpa (SILVEIRA et al., 2018).

4.2.2 Escolha das temperaturas de extração

Temperaturas de 30 °C, 40 °C, 50 °C e ambiente foram utilizadas em trabalhos cujo o objetivo foi extrair saponinas dos frutos da erva-mate, porém temperaturas mais elevadas não foram testadas (SILVA, 2016; PEIXOTO et al., 2012; TAKETA; BREITMAIER; SCHENKEL, 2004). Diante dos resultados obtidos a partir dessa análise exploratória, as temperaturas de extração de 55 °C e de 85 °C foram escolhidas para os ensaios de atividade alelopática.

O extrato obtido a 85 °C apresentou concentração de antioxidantes significativamente mais elevada que os demais, assim como observado por Wolff, Silveira e Lazzarotto (2019) para o extrato das folhas de *I. paraguariensis*. Enquanto o extrato de 55 °C apresentou a maior concentração de saponinas, no entanto não houve diferença significativa observada entre os extratos de 55 °C, 70 °C e 85 °C no teste do índice afrosimétrico utilizando teste estatístico de Tukey (1% e 5% de grau de significância) (TABELA 5). Porém, temperaturas de até 50 °C são usuais em trabalhos que buscam quantificar, isolar ou identificar saponinas (CHEOK; SALMAN; SULAIMAN, 2014). Além disso, na análise de temperatura de extração das saponinas de *Panax notoginseng* utilizando microondas, a temperatura de 50 °C apresentou os melhores resultados de rendimento (VONGSANGNAK et al., 2004).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS OBTIDOS A 55 °C E 85 °C A PARTIR DA PROGÊNIE PGFB (HFC10164)

Para a realização dos ensaios de atividade alelopática, novos extratos foram obtidos em duplicata nas temperaturas determinadas pelas análises anteriores. Para tanto, foi utilizado material genético coletado na Embrapa de Ponta Grossa (PGFB, código de registro: HFC10164). As mesmas análises de caracterização foram realizadas para esses extratos.

4.3.1 Densidade relativa

A análise de densidade relativa foi realizada em triplicata para cada extrato obtido. Diferentemente do observado na otimização do processo de extração avaliando temperatura, não houve diferença significativa entre os resultados dos

extratos de 55 °C e 85 °C, sendo obtidas densidades relativas de $0,9859^{aA} \pm 0,0066$ e $0,9826^{aA} \pm 0,0021$, respectivamente (de acordo com o teste de Tukey, médias com a mesma letra não diferem significativamente. Letras minúsculas correspondem ao teste com $p < 0,01$ e letras maiúsculas com $p < 0,05$).

4.3.2 Resíduo seco

Os resultados da análise de resíduo seco das amostras de 55 °C e 85 °C revelaram que não existe diferença significativa entre elas (55 °C - $0,8984^{aA} \pm 0,0208$ e 85 °C - $0,9239^{aA} \pm 0,0714$, sendo que de acordo com o teste de Tukey, médias com a mesma letra não diferem significativamente. Letras minúsculas correspondem ao teste com $p < 0,01$ e letras maiúsculas com $p < 0,05$). Esse resultado indica que ambas temperaturas proporcionaram extração similar de compostos, assim como observado durante otimização do processo de extração avaliando temperatura (SIMÕES et al., 2017, p. 93).

4.3.3 Cinzas totais

A quantidade de compostos inorgânicos extraídos quantificada pela análise de cinzas totais também não apresentou diferença significativa entre os extratos de 55 °C e 85 °C, assim como observado na otimização do processo de extração avaliando temperatura. Foram obtidos resultados de $0,0799^{aA} \pm 0,0270$ para o extrato de 55 °C e $0,0583^{Aa} \pm 0,0296$ para o extrato de 85 °C (de acordo com o teste de Tukey, médias com a mesma letra não diferem significativamente. Letras minúsculas correspondem ao teste com $p < 0,01$ e letras maiúsculas com $p < 0,05$).

4.3.4 Índice afrosimétrico

Os resultados de IA obtidos para os extratos de 55 °C e 85 °C foram de $5368^{aA} \pm 1555$ e $4836^{aA} \pm 928$, respectivamente (de acordo com o teste de Tukey, médias com a mesma letra não diferem significativamente. Letras minúsculas correspondem ao teste com $p < 0,01$ e letras maiúsculas com $p < 0,05$). As amostras foram diluídas na proporção 1:8 com água tipo II para adequação do resultado à

curva de espuma. As temperaturas de extração não apresentaram diferença significativa nos resultados dessa análise utilizando teste de Tukey.

4.3.5 Atividade antioxidante

Para análise da atividade antioxidante, o extrato de 85 °C foi diluído na proporção 1:10 para adequação dos valores de absorbância da amostra à curva padrão, sendo esse procedimento considerado para o cálculo do resultado. Foram obtidos valores de $25,470^{bB} \pm 1,014$ para o extrato de 55 °C e $104,796^{aA} \pm 3,966$ para o extrato de 85 °C (de acordo com o teste de Tukey, médias com a mesma letra não diferem significativamente. Letras minúsculas correspondem ao teste com $p < 0,01$ e letras maiúsculas com $p < 0,05$). Assim como observado na otimização do processo de extração avaliando temperatura, o extrato de 85 °C apresentou atividade antioxidante aproximadamente quatro vezes superior ao extrato de 55 °C.

4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS FRACIONADOS OBTIDOS POR SOXHLET

4.4.1 Rendimento de extração

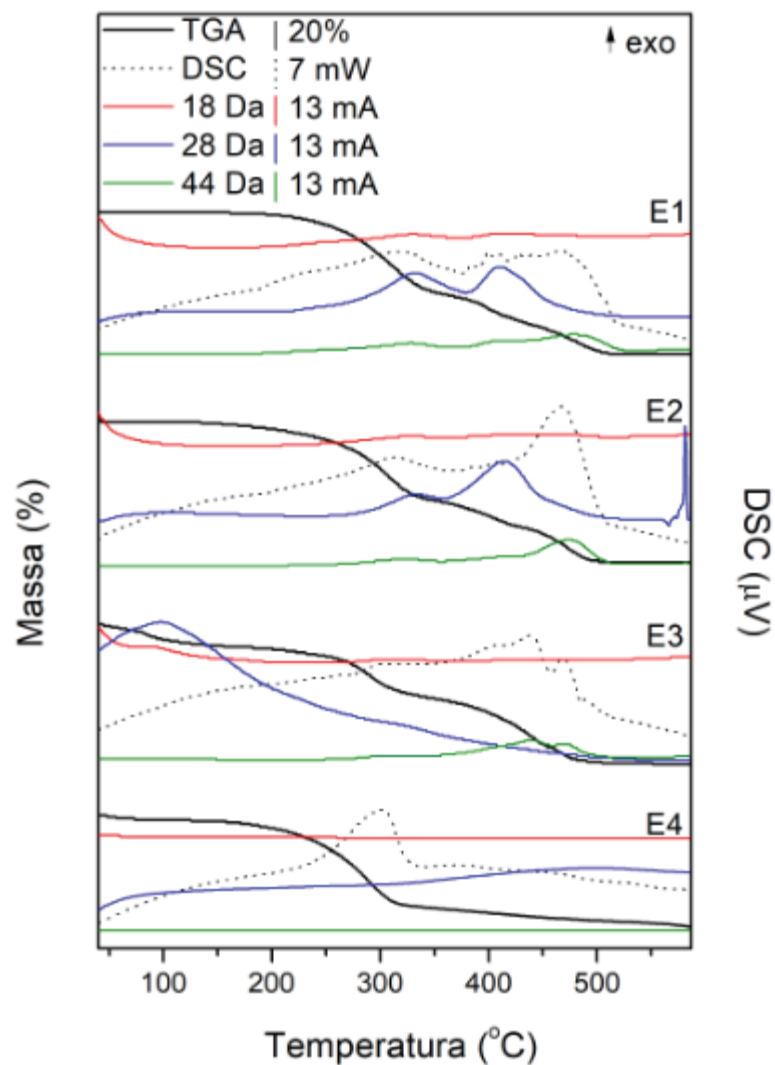
As frações orgânicas obtidas pela extração utilizando Soxhlet foram reduzidas à secura e a fração aquosa foi liofilizada, sendo calculado o rendimento em porcentagem de massa seca da fração em relação a massa de polpa do fruto seco inicialmente utilizada. Dessa forma, foram obtidos rendimentos de 5,2988% para fração de éter etílico, 0,3365% para a fração de acetato de etila, 10,2275% para a fração etanólica e 12,8769% para a fração aquosa. Esses resultados indicam que a polpa do fruto semi-maduro seco da erva-mate apresenta maior concentração de compostos hidrofílicos, uma vez que a fração aquosa apresentou o maior rendimento de extração.

4.4.2 Caracterização térmica dos extratos

Os extratos fracionados da polpa do fruto da erva-mate obtidos por Soxhlet foram analisados de acordo com as características de perda de massa de acordo

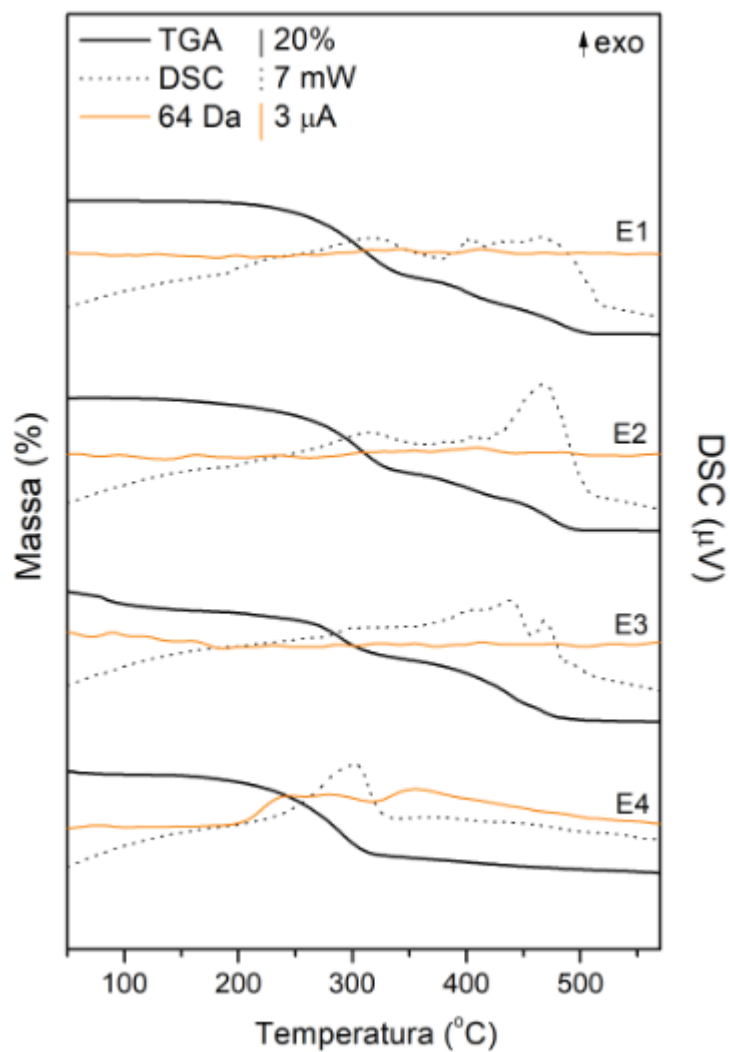
com o aumento da temperatura. Essa análise foi realizada por termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial acopladas a espectrometria de massas sob atmosfera de ar. As curvas de TGA-DSC obtidas são apresentadas nas (FIGURAS 13, 14). As frações éter etílico e acetato de etila apresentaram três eventos de perda de massa. A fração etanólica apresentou quatro eventos de perda de massa, sendo o primeiro relacionado a perda de água e compostos voláteis (entre 77 °C e 91 °C). No entanto, esses compostos não estavam presentes na fração aquosa, e somente um evento de perda de massa foi observado para essa fração. Esse evento apresentou temperaturas similares ao terceiro evento da fração éter etílico e segundo evento das frações acetato de etila e etanólica, ocorrendo entre 245 - 340 °C (46% - éter etílico), 267 - 332 °C (35% - acetato de etila), 268 - 313 °C (20% - etanol) e 240 - 312 °C (43% - água) (TABELA 7). Essa perda de massa pode ser relacionada à degradação de alcanos e volatilização (COSTA et al., 2013). Outro evento de perda de massa foi observado nas temperaturas de 393 - 409 °C (7% - éter etílico), 375 - 427 °C (14% - acetato de etila) e 399 - 454 °C (24% - etanol). Esse pode estar relacionado à reação de oxidação e degradação de compostos mais estáveis, além da formação inicial de compostos carbonáceos (MALUCELLI et al., 2018). A última perda de massa foi observada nas temperaturas de 459 - 512 °C (16% - éter etílico), 453 - 500 °C (22% - acetato de etila) e 464 - 524 °C (10% - etanol). Essa é relacionada à formação de cinzas. Apenas o extrato aquoso apresentou massa de cinzas significativa (20,4368%), como consequência da extração de compostos inorgânicos em meio aquoso.

FIGURA 13 – CURVAS DE TGA, DSC E CONTAGEM TOTAL DOS ÍONS DE 18 Da, 28 Da E 44 Da EM ATMOSFERA DE AR DOS EXTRATOS FRACIONADOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE OBTIDOS POR SOXHLET UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES: ÉTER ETÍLICO (E1), ACETATO DE ETILA (E2), ETANOL (E3) E ÁGUA (E4)



FONTE: A autora (2019).

FIGURA 14 - CURVAS DE TGA, DSC E CONTAGEM TOTAL DO ÍON DE 64 Da EM ATMOSFERA DE AR DOS EXTRATOS FRACIONADOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE OBTIDOS POR SOXHLET UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES: ÉTER ETÍLICO (E1), ACETATO DE ETILA (E2), ETANOL (E3) E ÁGUA (E4)



FONTE: A autora (2019).

(*) O valor de TIC está numa escala de 1:10.000 em comparação com a FIGURA 13.

TABELA 7 – DADOS DE TGA E DSC EM ATMOSFERA DE AR DOS EXTRATOS FRACIONADOS POR SOXHLET DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE, UTILIZANDO DIFERENTES SOLVENTES: ÉTER ETÍLICO (E1), ACETATO DE ETILA (E2), ETANOL (E3) E ÁGUA (E4)

Extratos	TG			DSC
	Eventos	Δm (%)	ΔT (°C)	T_p (°C)
(E1)	1º	-	-	200 (ombro)
	2º	-	-	230 (ombro)
	3º	46	245-340	316 (exo)
	4º	-	-	388 (exo)
	5º	-	-	392 (exo)
	6º	-	-	394 (ombro)
	7º	7	393-409	399 (exo)
	8º	-	-	411 (exo)
	9º	-	-	424 (ombro)
	10º	-	-	429 (exo)
	11º	-	-	449 (exo)
	12º	16	459-512	463 (exo)
(E2)	1º	-	-	204 (ombro)
	2º	35	267-332	315 (exo)
	3º	-	-	367 (exo)
	4º	-	-	378 (ombro)
	5º	-	-	402 (exo)
	6º	-	-	407 (exo)
	7º	-	-	415 (exo)
	8º	14	375-427	426 (exo)
	9º	22	453-500	468 (exo)
(E3)	1º	4	77-91	267 (ombro)
	2º	20	268-313	294 (ombro)
	3º	-	-	407 (ombro)
	4º	24	399-454	438 (exo)
	5º	10	464-524	468 (exo)
	6º	-	-	489 (exo)
(E4)	1º	43	240-312	302 (exo)
	2º	-	-	371 (exo)
	3º	-	-	468 (ombro)
	4º	-	-	531 (ombro)

Δm : perda de massa (%), ΔT : faixa de temperatura, T_p : temperatura de pico.

As frações E1, E2, E3 e E4, obtidas por soxhlet apresentaram um evento de perda de massa em comum, relacionado à degradação de alcanos (COSTA et al., 2013). As frações orgânicas de éter etílico e acetato de etila apresentaram comportamentos térmicos mais similares, o que indica similaridade de sua composição, uma vez que ambas as frações são constituídas por compostos de baixa polaridade (LOVAGLIO et al., 2017). A fração etanólica apresentou maior quantidade de eventos de perda de massa, o que evidencia maior complexidade de composição. No entanto, a fração éter etílico apresentou a maior quantidade de eventos no DSC, sendo todos exotérmicos, indicando maior variedade de reações de decomposição. Enquanto a fração aquosa apresentou um único evento de perda de massa, sendo a fração de menor complexidade dentre as obtidas.

Os fragmentos monóxido de carbono, dióxido de carbono e água são os produtos majoritários da reação de degradação e oxidação de compostos orgânicos na presença de oxigênio (LISA et al., 2016). Os íons desses fragmentos (CO_2 - 44 Da, CO - 28 Da e H_2O - 18 Da) foram monitoradas. O íon de 18 Da apresentou um pico de TIC (*total ion count*) durante a degradação térmica da fração etanólica, sendo a única fração que apresentou água em sua composição.

O íon de 28 Da apresentou o maior valor de TIC durante os primeiros eventos de perda de massa observados para todas as frações. No entanto, não foi observado um pico desse íon durante o evento de perda de massa da fração aquosa, enquanto que para os demais extratos observou-se um pico. Também foi observado um pico do íon de 28 Da no segundo evento de perda de massa das frações éter etílico, acetato de etila e etanol. Os fragmentos CO, CH_2N e C_2H_4 apresentam 28 Da, no entanto, se tratando de temperaturas acima de 300 °C em atmosfera de ar existe maior probabilidade desse fragmento se tratar de CO, por se tratar de eventos de decomposição e oxidação. Enquanto que o pico de 28 Da próximo à 100 °C na decomposição da fração etanólica pode estar relacionado ao fragmento C_2H_4 , uma vez que está relacionado a decomposição do solvente (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). Portanto, a primeira perda de massa do extrato etanólico está mais provavelmente relacionada à volatilização de compostos orgânicos e decomposição do próprio solvente do que à perda de água. No caso de compostos voláteis, eles não foram observados nas demais frações.

O íon de 44 Da apresentou um pico durante o terceiro evento de perda de massa de todas as frações orgânicas e no quarto evento da fração etanólica. O fragmento CO_2 apresenta essa massa, no entanto, outros fragmentos também: N_2O , CH_2NO , CH_4N_2 , $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$, $\text{C}_2\text{H}_6\text{N}$ e C_3H_8 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007). No entanto, por se tratar de uma decomposição térmica na presença de ar, em temperaturas acima de 300 °C, o íon de 44 Da está mais provavelmente relacionada ao fragmento CO_2 .

Os eventos de maior perda de massa das frações éter etílico e acetato de etila podem ser principalmente relacionados a perda de monóxido de carbono. A soma da porcentagem de perda de massa dos eventos relacionados a esse fragmento é de 53% - éter etílico, 49% - acetato de etila e 24% - etanol. Por outro lado, o evento de maior perda de massa da fração etanólica pode ser principalmente relacionado a perda de dióxido de carbono. As somas das porcentagens de perda de

massa dos eventos relacionados a esse fragmento são de 16% - éter etílico, 22% - acetato de etila e 34% - etanol. Esta comparação permite avaliar que a fração etanólica apresenta maior concentração de compostos mais resistentes a degradação térmica, que não foram completamente carbonizados.

O íon de 64 Da apresentou a maior variação de TIC durante a faixa de temperatura do evento de perda de massa do extrato aquoso, sendo observados dois picos (FIGURA 14). A massa de 64 Da pode estar relacionada ao fragmento C_5H_4 , que também é observado como um intermediário na oxidação de benzeno e tolueno (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007; NGUYEN; LE; MEBEL, 2001).

4.5 ANÁLISE DE ATIVIDADE ALELOPÁTICA DOS EXTRATOS AQUOSOS OBTIDOS A 55 °C E 85 °C A PARTIR DA PROGÊNIE PGFB (HFC10164)

A atividade alelopática dos extratos da polpa do fruto da erva-mate foi realizada utilizando teste de germinação, cujo resultado foi avaliado conforme as normas RAS e OCDE. Além disso, foi realizada análise do crescimento primário, por meio da avaliação da medida da parte aérea das plântulas e cálculo de índice de estímulo/inibição de crescimento.

4.5.1 Avaliação da porcentagem de germinação pelo método RAS

O método RAS considera sementes germinadas aquelas que aparentam capacidade de produzir uma planta considerada normal (BRASIL, 2009). Durante análise das sementes de cebola, alface e picão-preto, foi observado que a maior parte delas, e em alguns casos a sua totalidade, apresentou anormalidades (quando comparadas as plântulas consideradas normais do grupo controle) ou ausência das partes essenciais da plântula (FIGURAS 15, 16, 17). Por isso, foi observado que os extratos da polpa do fruto da erva-mate causaram diminuição ou até ausência de germinação das espécies testadas utilizando método RAS de avaliação.

Na análise de germinação das sementes de cebola, foi observado que os extratos apresentaram efeito sobre a germinação, porém não houve diferença significativa entre eles ($6\% \pm 7\%$ - 55 °C, $14\% \pm 6\%$ - 85 °C) (TABELA 8). No entanto, as plântulas tratadas com extrato de 55 °C apresentaram anormalidades mais acentuadas comparadas às tratadas com extrato de 85 °C (FIGURA 15). As

anormalidades apresentadas pelas plântulas de cebola foram: raiz primária curta, grossa, desproporcional às demais estruturas e cotilédone encurtado (BRASIL, 2009).

FIGURA 15 – ANORMALIDADES DAS PLÂNTULAS DE CEBOLA (*A. cepa*) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE DURANTE GERMINAÇÃO: a) EXTRATO DE 55 °C; b) EXTRATO DE 85 °C; c) PLÂNTULAS CONSIDERADAS NORMAIS



FONTE: A autora (2019).

TABELA 8 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CEBOLA (*A. cepa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO RAS

Espécie	Tratamento	% Germinação
<i>A. cepa</i>	Extrato 55 °C	6 ± 7
	Extrato 85 °C	14 ± 6
	Grupo Controle	82 ± 8

Segundo teste de Kruskal-Wallis existe diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos e não existe diferença significativa entre os tratamentos.

As sementes de alface tratadas com os extratos da polpa do fruto da erva-mate apresentaram ausência de germinação utilizando método RAS (TABELA 9).

Isso se deve a sensibilidade da alface à aleloquímicos (MACÍAS; CATELLANO; MOLINILLO, 2000). As anormalidades apresentadas pelas plântulas de alface submetidas aos tratamentos foram: radícula curta, desproporcional às demais estruturas, com coloração amarronzada e hipocótilo encurtado. Também foi observado que as anormalidades foram mais severas nas plântulas tratadas com extrato de 55 °C (FIGURA 16).

FIGURA 16 – ANORMALIDADES DAS PLÂNTULAS DE ALFACE (*L. sativa*) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE DURANTE GERMINAÇÃO: a) EXTRATO DE 55 °C; b) EXTRATO DE 85 °C; c) PLÂNTULAS CONSIDERADAS NORMAIS



FONTE: A autora (2019).

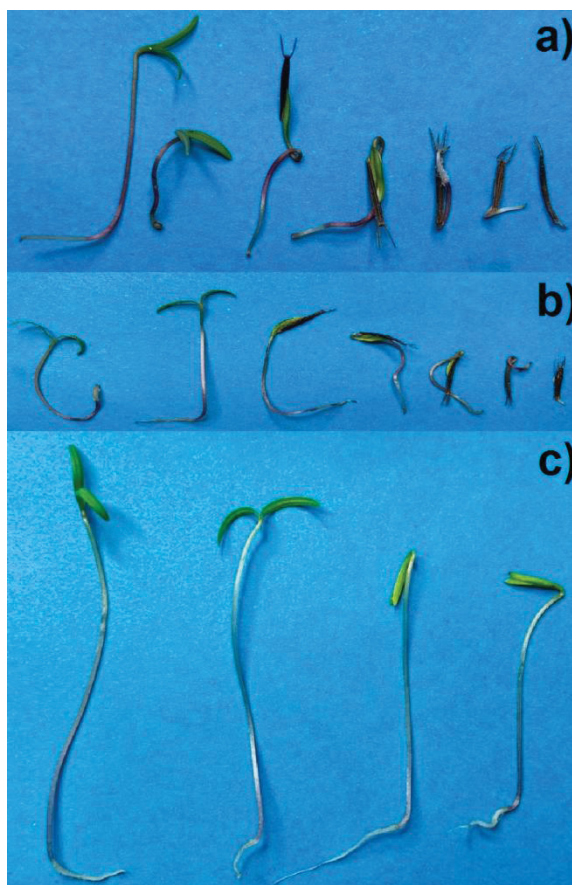
TABELA 9 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE (*L. sativa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO RAS

Espécie	Tratamento	% Germinação
<i>L. sativa</i>	Extrato 55 °C	0
	Extrato 85 °C	0
	Grupo Controle	70 ± 4

Segundo teste de Kruskal-Wallis existe diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos e não existe diferença significativa entre os tratamentos.

As sementes de picão-preto tratadas com extrato de 55 °C apresentaram ausência de germinação, enquanto aquelas tratadas com extrato de 85 °C apresentaram germinação de 5% ± 2%, portanto o primeiro extrato causou maior inibição (TABELA 10). As anormalidades observadas nas plântulas de picão-preto foram: radícula curta, grossa, amarronzada e hipocótilo encurtado e torcido (FIGURA 17).

FIGURA 17 – ANORMALIDADES DAS PLÂNTULAS DE PICÃO-PRETO (*B. pilosa*) APÓS TRATAMENTO COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE DURANTE GERMINAÇÃO: a) EXTRATO DE 55 °C; b) EXTRATO DE 85 °C; c) PLÂNTULA CONSIDERADA NORMAL



FONTE: A autora (2019).

TABELA 10 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PICÃO-PRETO (*B. pilosa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO RAS

Espécie	Tratamento	% Germinação
<i>B. pilosa</i>	Extrato 55 °C	0
	Extrato 85 °C	5 ± 2
	Grupo Controle	74 ± 5

Segundo teste de Kruskal-Wallis existe diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos e entre os tratamentos.

4.5.2 Avaliação da porcentagem de germinação pelo método OCDE

Para avaliação da germinação utilizando método OCDE, foram consideradas sementes germinadas aquelas que apresentaram aparecimento do cotilédone, ou seja, emergência (OCDE, 2006). Portanto, as plântulas anormais foram contabilizadas dentre as germinadas. As anormalidades encontradas foram descritas anteriormente. Dentre as espécies testadas, picão-preto apresentou porcentagens de germinação reduzidas pelo efeito dos extratos.

Os resultados de germinação obtidos para cebola para os diferentes tratamentos apresentaram similaridades (95% ± 4%, 97% ± 1% e 98% ± 3% para os extratos de 55 °C, 85 °C e grupo controle). No entanto, 90% ± 3% (extrato de 55 °C) e 84% ± 6% (extrato de 85 °C) das plântulas apresentaram anormalidades, havendo diferença significativa entre a porcentagem de plântulas anormais nos grupos tratados com os extratos em comparação ao controle (16% ± 6%) (TABELA 11).

TABELA 11 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE CEBOLA (*A. cepa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO OCDE

Espécie	Tratamento	% Germinação	% Plântulas Anormais
<i>A. cepa</i>	Extrato 55 °C	95 ± 4	90 ^{aA} ± 3
	Extrato 85 °C	97 ± 1	84 ^{aA} ± 6
	Grupo Controle	98 ± 3	16 ^{bB} ± 6

Segundo teste de Kruskal-Wallis não existe diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos e entre os tratamentos para os resultados de porcentagem de germinação. (*) Médias com a mesma letra na coluna não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey. Letras minúsculas correspondem ao teste com $p < 0,01$ e letras maiúsculas com $p < 0,05$.

Quanto a porcentagem de germinação, as sementes de alface tratadas com extratos não apresentaram diferença significativa comparadas ao grupo controle (85% ± 3% - 55 °C; 87% ± 7% - 85 °C; 88% ± 6% - controle). No entanto, todas as

sementes germinadas dos grupos tratados com extratos apresentaram anormalidades, enquanto a porcentagem de plântulas anormais do grupo controle foi de $18\% \pm 5\%$ (TABELA 12).

TABELA 12 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE (*L. sativa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO OCDE

Espécie	Tratamento	% Germinação	% Plântulas Anormais
<i>L. sativa</i>	Extrato 55 °C	85 ± 3	$85^{aA} \pm 3$
	Extrato 85 °C	87 ± 7	$87^{aA} \pm 7$
	Grupo Controle	88 ± 6	$18^{bB} \pm 5$

Segundo teste de Kruskal-Wallis não existe diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos e entre os tratamentos para os resultados de porcentagem de germinação. (*) Médias com a mesma letra na coluna não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey. Letras minúsculas correspondem ao teste com $p < 0,01$ e letras maiúsculas com $p < 0,05$.

A porcentagem de germinação das sementes de picão-preto tratadas com os extratos foi inferior à do grupo controle ($73\% \pm 5\%$ - 55 °C; $67\% \pm 10\%$ - 85 °C; $88\% \pm 6\%$ - controle) (TABELA 13). Indicando que a planta daninha foi a única espécie testada nesse estudo que apresentou redução da porcentagem de germinação com o tratamento utilizando os extratos da polpa do fruto da erva-mate, não havendo diferença significativa entre a temperatura de extração. Todas as sementes germinadas no tratamento com extrato de 55 °C apresentaram anormalidades, no entanto não houve diferença significativa da porcentagem de plântulas anormais entre os extratos, porém, o grupo controle apresentou resultado significativamente inferior.

TABELA 13 – PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE PICÃO-PRETO (*B. pilosa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE UTILIZANDO MÉTODO OCDE

Espécie	Tratamento	% Germinação	% Plântulas Anormais
<i>B. pilosa</i>	Extrato 55 °C	73 ± 5	$73^{aA} \pm 5$
	Extrato 85 °C	67 ± 10	$62^{aA} \pm 12$
	Grupo Controle	88 ± 6	$14^{bB} \pm 10$

Segundo teste de Kruskal-Wallis existe diferença significativa entre o grupo controle e os tratamentos e não existe diferença significativa entre os tratamentos para os resultados de porcentagem de germinação. (*) Médias com a mesma letra na coluna não diferem significativamente de acordo com o teste de Tukey. Letras minúsculas correspondem ao teste com $p < 0,01$ e letras maiúsculas com $p < 0,05$.

Diante dos resultados, é possível observar que os extratos da polpa do fruto da erva-mate exerceram maior impacto sobre a germinação das sementes de picão-

preto quando avaliado pelo método OCDE e sobre alface utilizando método RAS. A maior parte dos trabalhos que descrevem o método de avaliação de sementes germinadas utiliza a observação da protusão da radícula, ou seja, não leva em conta a normalidade da plântula, assim como o método OCDE (BRESSAN et al., 2016; MACÍAS; CASTELLANO; MOLINILLO, 2000; TURNES et al., 2014). No entanto, a análise da porcentagem de germinação por si só tem sido vista como insuficiente para análise da atividade alelopática, por isso foi realizada análise de crescimento primário (ANJUM; BAJWA, 2005).

4.5.3 Avaliação do índice de inibição/estímulo da parte aérea

O índice de inibição/estímulo da parte aérea foi calculado para análise do crescimento primário das espécies testadas sob efeito do tratamento com os extratos da polpa do fruto da erva-mate. Foram observadas atividades inibitórias dos extratos sobre o crescimento da parte aérea das plântulas de todas as espécies (FIGURAS 18, 19, 20), além disso, é possível observar que a diminuição da radícula causou diferença no posicionamento das plântulas dos grupos tratados com extratos comparadas às do grupo controle, que se mantém verticalmente.

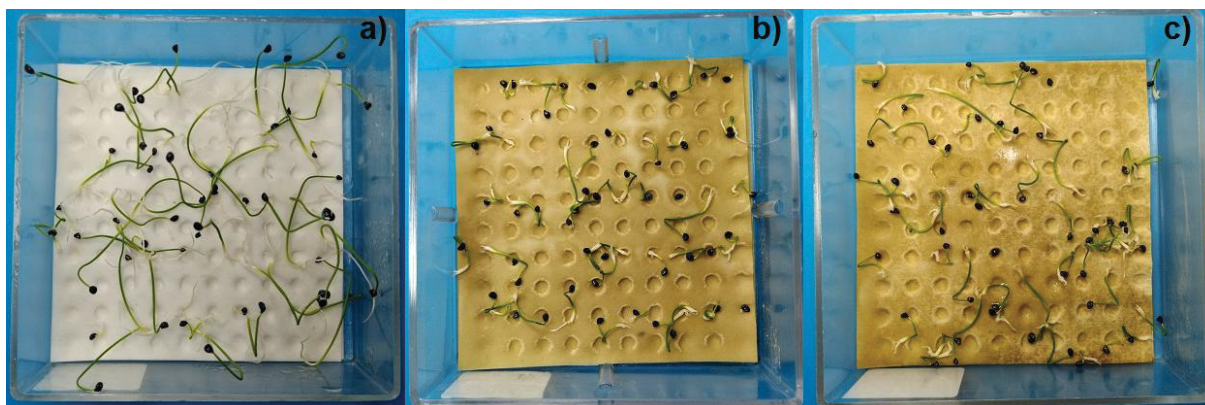
Não houve diferença significativa de inibição do crescimento da parte aérea das plântulas de cebola quando comparados os extratos de 55 °C (43%) e 85 °C (40%) (TABELA 14).

TABELA 14 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO/ESTÍMULO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE CEBOLA (*A. cepa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Espécie	Tratamento	II/IE%
<i>A. cepa</i>	Extrato 55 °C	-43 ± 12
	Extrato 85 °C	-40 ± 9

II/IE% negativo indica inibição e positivo indica estímulo. Segundo teste de Kruskal-Wallis não existe diferença significativa entre os extratos.

FIGURA 18 – PLÂNTULAS DE CEBOLA (*A. cepa*) APÓS TRATAMENTO DURANTE GERMINAÇÃO UTILIZANDO EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE: a) GRUPO CONTROLE; b) EXTRATO DE 55 °C; c) EXTRATO DE 85 °C



FONTE: A autora (2019).

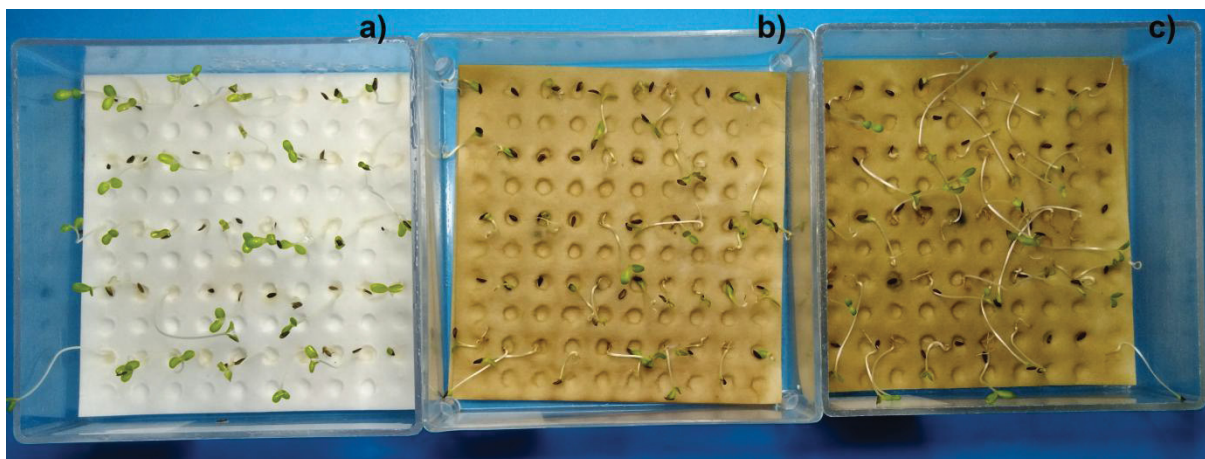
Na análise das plântulas de alface, o extrato de 85 °C não causou estímulo ou inibição do crescimento da parte aérea. O extrato de 55 °C inibiu em 18% o crescimento, portanto seu efeito foi mais severo (TABELA 15).

TABELA 15 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO/ESTÍMULO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE ALFACE (*L. sativa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Espécie	Tratamento	II/IE%
<i>L. sativa</i>	Extrato 55 °C	-18 ± 16
	Extrato 85 °C	1 ± 12

II/IE% negativo indica inibição e positivo indica estímulo. Segundo teste de Kruskal-Wallis existe diferença significativa entre os extratos.

FIGURA 19 – PLÂNTULAS DE ALFACE (*L. sativa*) APÓS TRATAMENTO DURANTE GERMINAÇÃO UTILIZANDO EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE: a) GRUPO CONTROLE; b) EXTRATO DE 55 °C; c) EXTRATO DE 85 °C



FONTE: A autora (2019).

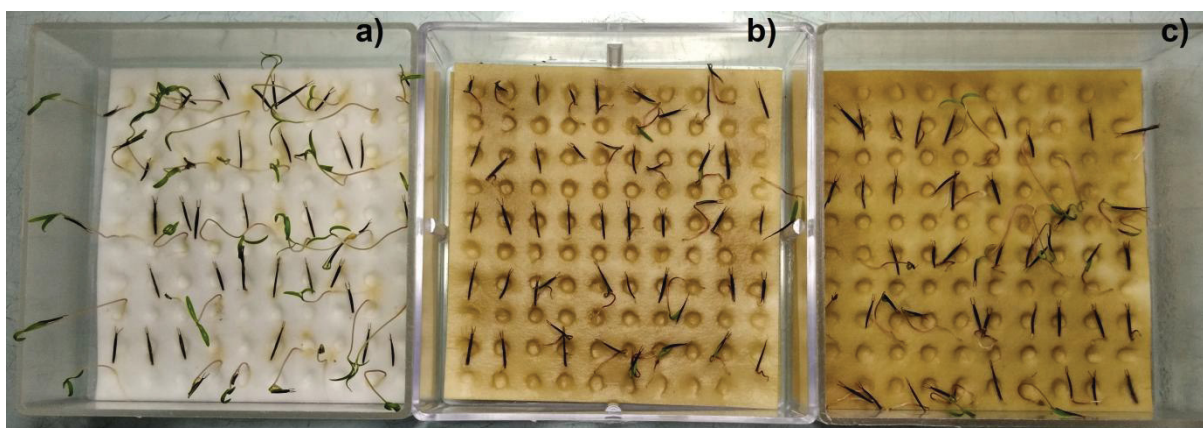
Na análise das sementes de picão-preto, os extratos de 55 °C e 85 °C apresentaram diferença significativa de inibição do crescimento da parte aérea (54% e 35%, respectivamente). Novamente, o extrato de 55 °C apresentou efeito mais severo (TABELA 16).

TABELA 16 – ÍNDICE DE INIBIÇÃO/ESTÍMULO DA PARTE AÉREA DE PLÂNTULAS DE PICÃO-PRETO (*B. pilosa*) TRATADAS COM EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE

Espécie	Tratamento	II/IE%
<i>B. pilosa</i>	Extrato 55 °C	-54 ± 3
	Extrato 85 °C	-35 ± 12

II/IE% negativo indica inibição e positivo indica estímulo. Segundo teste de Kruskal-Wallis existe diferença significativa entre os extratos.

FIGURA 20 – PLÂNTULAS DE PICÃO-PRETO (*B. pilosa*) APÓS TRATAMENTO DURANTE GERMINAÇÃO UTILIZANDO EXTRATOS DA POLPA DO FRUTO DA ERVA-MATE: a) GRUPO CONTROLE; b) EXTRATO DE 55 °C; c) EXTRATO DE 85 °C



FONTE: A autora (2019).

Diante dos resultados de atividade alelopática, observou-se que utilizando o método RAS (que leva em conta a qualidade da plântula germinada para porcentagem de germinação), ambos extratos da polpa do fruto da erva-mate (obtidos a 55 °C e 85 °C) causaram efeito inibitório sobre a germinação da cebola, alface e picão-preto. No entanto, somente na análise da erva daninha houve diferença significativa entre os extratos, sendo que o de 55 °C levou à ausência de germinação. Ausência de sementes germinadas também foi observada na análise da alface para ambos tratamentos.

Na avaliação da porcentagem de germinação utilizando método OCDE (que não leva em conta a qualidade da plântula germinada para porcentagem de germinação) foi observado que os extratos diminuíram a germinação das sementes

de picão-preto, no entanto, não afetaram significativamente a germinação da cebola e alface. Não houve diferença significativa de resultados entre as diferentes temperaturas de extração. Testes de germinação e emergência em solo estão sendo desenvolvidos para avaliar a relação das anormalidades das plântulas com o seu potencial de desenvolvimento.

Quanto a análise de porcentagem de plântulas anormais, todas as sementes tratadas com os extratos da polpa do fruto da erva-mate apresentaram maior porcentagem de plântulas anormais quando comparadas aos grupos controle. Para essas análises, não foi observada diferença significativa entre os extratos. No entanto, diante da observação das plântulas (FIGURAS 15-17), o extrato de 55 °C levou ao desenvolvimento de plântulas com anormalidades mais acentuadas, quando comparado ao extrato de 85 °C.

Quanto aos resultados de inibição/estímulo do crescimento da parte aérea, houve inibição do crescimento de todas as espécies tratadas com ambos extratos. Com exceção das sementes de alface tratadas com extrato de 85 °C, que não sofreram influência. Para análise da cebola, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Para as sementes de alface, o extrato de 55 °C apresentou efeito negativo sobre o crescimento da parte aérea ($-18\% \pm 16\%$). Para as sementes de picão-preto, o extrato de 55 °C apresentou efeito inibitório mais pronunciado ($-54\% \pm 3\%$) comparado ao extrato de 85 °C ($-35\% \pm 12\%$).

A temperatura de extração de 85 °C foi escolhida para os testes de germinação e crescimento primário em solo, que estão em desenvolvimento. O extrato obtido nessa temperatura inibiu a germinação e crescimento da parte aérea do picão-preto e não causou efeito negativo sobre o crescimento da parte aérea da alface.

As diferentes composições de extratos levam à diferentes resultados de atividade alelopática, assim como observado nos resultados apresentados. Na literatura, encontram-se resultados de estímulo do crescimento da parte aérea de diferentes espécies tratadas com extratos vegetais. Extratos das folhas, raízes e caule de *A. conyzoides* (mentrasto) foram testados em diferentes concentrações utilizando sementes de rabanete. Os extratos da raiz e caule de 5 até 100 g/L promoveram crescimento da parte aérea e o extrato das folhas nas concentrações de 50 e 100 g/L promoveram inibição do crescimento da parte aérea. O comprimento

da radícula foi diminuído na influência de todos os extratos na concentração de 100 g/L, sendo mais intenso para o extrato das folhas (XUAN et al., 2016).

Em estudo realizado com o extrato das folhas da erva-mate, houve estímulo de 50% do crescimento de raízes de grãos de trigo. Nesse estudo o extrato foi obtido utilizando água fervente tempo de extração de 5 minutos, na concentração de 0,1 g.mL⁻¹ (GONZÁLEZ et al., 1993).

Turnes et al. (2014) observaram estímulo da germinação de sementes de alface sob tratamento com frações do extrato de cascas de mamica-de-cadela (*Z. rhoifolium*). A fração clorofórmica estimulou o crescimento do hipocótilo em 41% e da radícula em 144% na concentração de 0,4 mg para 3 mL. Esse estudo considerou sementes germinadas aquelas que apresentaram protusão visível da radícula. Diferentes concentrações das frações foram testadas, no entanto, não foi observada relação dose-dependente da atividade alelopática. Assim como não foi possível estabelecer relação entre o potencial antioxidante das frações e os efeitos alelopáticos. Oliveira et al. (2019) também observaram ausência de relação dose-resposta no crescimento primário de alface e cebola, no entanto, determinadas concentrações de frações do extrato de erva-cidreira brava (*Lippia alba*) provocaram efeitos de estímulo do crescimento das plântulas, enquanto em sua maioria foi observado efeito de inibição.

Bioestimulantes são extratos de material orgânico que contêm compostos bioativos como minerais, vitaminas, aminoácidos, polissacarídeos, oligossacarídeos, quitina, quitosana, entre outros. Seu uso é incentivado para redução de fertilizantes. Extratos de algas marinhas são comumente utilizados como bioestimulantes. Sua atividade pode estar relacionada a presença de hormônios vegetais, porém, por se tratar de uma composição complexa, se torna difícil a identificação de compostos bioativos específicos (BATTACHARYYA et al., 2015; BULGARI et al., 2015). Portanto, o resultado de IE de 1% ± 12% observado para o crescimento da parte aérea da alface pode estar relacionado a presença de minerais, vitaminas, aminoácidos e carboidratos e deve ser esclarecido em estudos prospectivos. Barbosa et al. (2015) estudaram a composição elementar de frutos imaturos de *I. paraguariensis*, observando diversos minerais, dentre os quais destaca-se o potássio, por estar presente em maior concentração no fruto do que na folha. Além disso, foi observado que muitos elementos que constituem o fruto são mais solúveis em água a 100 °C do que os que constituem a folha.

A variação de composição dos extratos de plantas colhidas em diferentes estações do ano também leva a diferentes resultados de atividade alelopática. Compostos voláteis de folhas frescas de erva-formigueira (*H. psiadioides*) colhidas no inverno e primavera inibiram a germinação de sementes de cebola em 47% e 25% respectivamente, sendo as maiores taxas de inibição dentre as colheitas realizadas nas demais estações do ano. Enquanto os compostos voláteis de folhas frescas de *Baccharis patens* apresentaram maior taxa de inibição de germinação nas estações inverno (15%) e outono (11%). Nas mesmas condições, o extrato de *H. psiadioides* inibiu germinação de sementes de alface em 7% e 2%. Os autores não descreveram os critérios para avaliação da semente germinada (SILVA; OVERBECK; SOARES, 2014).

Compostos voláteis de *H. psiadioides* nas condições que apresentaram resultado mais significativo (folhas frescas colhidas na primavera), inibiram o crescimento da parte aérea de plântulas de cebola em 43%, enquanto os compostos voláteis de folhas *B. patens* colhidas nas mesmas condições inibiram em 19%. O crescimento da parte aérea de sementes de alface foi inibido em 32% e 24% pelos extratos de *H. psiadioides* e *B. patens* nas condições descritas (SILVA; OVERBECK; SOARES, 2014).

O crescimento diminuído de radículas e partes aéreas também foi observado em estudos em que sementes de alface foram submetidas a presença de compostos fitotóxicos extraídos de outras espécies. O extrato de malícia-de-boi (*Mimosa pigra*) na maior concentração testada (10 g de peso seco por Litro) inibiu o crescimento da parte aérea em $41,44\% \pm 0,6\%$ (KODKAEW et al., 2018). Extratos da raiz, casca da raiz, caule e casca do caule de embaúba (*C. pachystachya*) inibiram a germinação de sementes de alface em 49,35%, 40,0%, 78,7% e 81,7%, respectivamente. O crescimento da parte aérea foi inibido em 13,28%, 15,1%, 34,3% e 13,4%, respectivamente, e o crescimento da radícula também apresentou inibição (PEREIRA et al., 2017). Os estudos citados não descrevem os critérios adotados para análise de sementes germinadas.

A inibição do crescimento da radícula provocada pela presença de aleloquímicos pode estar relacionada a problemas de divisão celular, sinalização hormonal, desregulação do ciclo celular e estresse oxidativo (DMITROVIĆ et al., 2015). Da mesma forma, a observação da radícula com coloração amarronzada

pode ser observada na presença de compostos fitotóxicos nos extratos que causam diminuição do crescimento e necrose (KOOKAEW et al., 2018; UDDIN et al., 2007).

Diminuição do comprimento da parte aérea de picão-preto (de $2,35 \text{ cm} \pm 0,13 \text{ cm}$ para $0,37 \text{ cm} \pm 0,08 \text{ cm}$) foi observada sob efeito de extrato de losna-branca (*P. hystrophorus*) na concentração de $760 \text{ } \mu\text{M}$ (BATISH et al., 2002). Ausência de germinação de sementes de picão-preto também foi observada sob tratamento com extrato pirolenhoso (500 L.ha^{-1}), conforme avaliação utilizando método RAS (ZEFERINO; LIMA; VIEIRA, 2018).

Plantas daninhas causam prejuízo a qualidade e rendimento da produção de hortaliças, pois as hortaliças se desenvolvem mais lentamente no início do crescimento e sofrem maiores influências nesse período. As plantas daninhas, por sua vez, dificultam colheitas e o preparo do solo. Portanto, busca-se herbicidas que controlem seu crescimento e agridam minimamente as hortaliças (PEREIRA, 1987). Extratos vegetais aquosos têm sido usados em conjunto com herbicidas sintéticos para a redução da dose desses compostos (FAROOQ et al., 2013). A partir dos resultados obtidos na análise de atividade alelopática do extrato da polpa do fruto da erva-mate sobre a germinação e crescimento primário de picão-preto, a investigação da possibilidade dessa aplicação para esse subproduto agrícola pode contribuir para diminuição do uso de herbicidas sintéticos.

Bressan et al. (2016) testaram atividade alelopática de extratos aquosos das folhas de *I. paraguariensis* sobre sementes de cártamo (*C. tinctorius*) nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 100% realizado utilizando moagem das folhas junto ao solvente (200 g.L^{-1}). O ensaio de alelopatia foi realizado em solo e o critério de observação de semente germinada foi de protusão, sem considerar anormalidades. A taxa de germinação não apresentou diferença significativa quando comparados os grupos tratados com o controle. No entanto, houve estímulo do crescimento da parte aérea, de $15,98 \pm 1,58 \text{ mm}$ (do controle) para $20,66 \pm 2,27 \text{ mm}$ (tratamento com 50% do extrato).

Na literatura foi estabelecida relação entre a hidrofobicidade dos compostos e seu respectivo efeito fitotóxico. Os compostos mais hidrofóbicos passam mais facilmente pelas membranas celulares, portanto apresentam maior fitotoxicidade (JITAREANU et al., 2011; PINHO et al., 2017). As saponinas são alvo de investigação de diversos autores sobre diferentes efeitos biológicos (CHEOK; SALMAIN; SULAIMAN, 2014). Saponinas do chá isoladas ou em combinação com

imazalil e procloraz apresentam efeito fungicida sobre os fungos verde e azul, causados por *Penicillium digitatum*, *P. italicum* e *Geotrichum candidum* na pós-colheita de tangerina (*Citrus reticulata*) (HAO et al., 2010). As saponinas de feijão *moyashi* (*Vigna radiata*) estimularam o crescimento de plantas da mesma espécie, portanto também podem apresentar atividade estimulante (WALLER et al., 1999). Diversas saponinas apresentam atividade alelopática, como as extraídas da raiz da alfafa, amplamente estudadas pois inibem a germinação de sementes de diferentes espécies (WALLER; YAMASAKI, 1996).

Muitos estudos atribuem atividade fitotóxica de extratos aos polifenóis que os constituem (DERMECHE et al., 2013; PINHO et al., 2017; MACÍAS et al., 2007). Silva et al. (2013) relacionaram a atividade alelopática da casca do fruto do café a sua concentração de compostos fenólicos, cafeína e atividade antioxidante. O extrato testado em diferentes concentrações inibiu o crescimento de radícula, hipocótilo e a porcentagem de germinação de picão-preto (*B. pilosa*), alface (*L. sativa*) e nabo (*Brassica chinensis*).

Os compostos fenólicos podem causar aumento da permeabilidade celular, inclusive aumentando a peroxidação lipídica. Também podem dificultar a absorção de nutrientes, dificultando o crescimento e levando inclusive a morte da planta. Estudos mostraram que eles podem inibir a divisão celular, alterar estruturas celulares e enzimas, diminuir a absorção de oxigênio, reduzir o conteúdo de clorofila, diminuir a fotossíntese e afetar a síntese de hormônios e proteínas (LI et al., 2010).

Por outro lado, Hayat et al. (2018) observaram que extratos aquosos de alho, em baixas concentrações, estimularam o crescimento de plântulas de tomate, enquanto mais altas concentrações inibiram. Esse fenômeno foi atribuído a presença de alicina, um composto que apresenta atividade antioxidante, que em altas concentrações pode promover essa fitotoxicidade. Porém, em concentrações mais baixas, os compostos antioxidantes podem estimular funções de defesa da planta. Alicina e outros compostos antioxidantes podem levar a um desequilíbrio considerado não-alarmante nos níveis de radicais livres, pois levou a alterações brandas nas membranas celulares. Esse desequilíbrio resultou, por meio de sinais que geram respostas celulares, em um aumento da atividade de enzimas antioxidantes como mecanismo de controle, resultando no estímulo de crescimento.

Schubert et al. (2007) observaram que os polifenóis dos extratos de frutos da erva-mate são diretamente relacionados ao seu potencial antioxidante testado pelo

método do DPPH. Segundo Borré et al. (2010), os compostos fenólicos da espécie são ácidos fenólicos e flavonoides. Portanto, diante dos resultados apresentados nesse trabalho, os compostos fenólicos dos extratos da polpa do fruto da erva-mate podem estar relacionados à sua toxicidade. No entanto, diante das anormalidades mais acentuadas observadas nas plântulas de cebola, alface e picão-preto tratadas com o extrato de 55 °C, suspeita-se também da toxicidade das saponinas do extrato, uma vez que essa temperatura é indicada para extração mais eficiente desses compostos. A alelopatia é um fenômeno complexo que resulta do sinergismo entre características como pH, salinidade, nutrientes e a presença de compostos como fenóis, ácidos graxos, lipídeos, ácidos orgânicos, etc (BARRAL; PARADELO, 2011).

5 CONCLUSÃO

A partir da caracterização da polpa do fruto semi-maduro da erva-mate foi possível concluir que ela se apresenta na proporção de 1:3 em relação à semente no fruto seco, e é constituída de aproximadamente 6% de compostos inorgânicos e 11% de perda por dessecação.

Na otimização do processo de extração avaliando temperatura foi possível observar que a densidade dos extratos indicou diferença de composição entre eles. Os extratos de 55 °C, 70 °C e 85 °C apresentaram concentração semelhante de saponinas a partir de análise adaptada do índice afrosimétrico. No entanto, o extrato de 85 °C proporcionou extração mais eficiente de compostos antioxidantes analisados pelo método adaptado utilizando DPPH. As temperaturas de extração de 55 °C e 85 °C foram escolhidas para análise de atividade alelopática.

A extração total e fracionada obtida por Soxhlet proporcionou amostras de diferentes composições, o que pôde ser observado nos resultados de TGA-DSC-MS. As frações obtidas utilizando solventes orgânicos apresentaram maior semelhança entre si, sendo sua maior perda de massa relacionada principalmente à liberação de monóxido de carbono. No entanto, a fração etanólica apresentou sua maior perda de massa relacionada a liberação de dióxido de carbono, portanto maior concentração de compostos mais resistentes a degradação térmica. Além disso, a fração etanólica exibiu a maior complexidade de composição, sendo a única a apresentar compostos voláteis. Compostos inorgânicos foram observados apenas no extrato aquoso, a partir da obtenção de cinzas (20,4368%). Esse extrato também apresentou a menor complexidade, sendo seu único evento de perda de massa relacionado principalmente a liberação do fragmento C_5H_4 , observado durante a oxidação de compostos como benzeno e tolueno.

A partir das análises de atividade alelopática dos extratos aquosos de 55 °C e 85 °C, foi observada diminuição ou até ausência de germinação das espécies testadas utilizando método RAS de avaliação. Para as plântulas de cebola (*A. cepa*), o extrato de 55 °C causou maior inibição da germinação (6% de sementes germinadas). Para picão-preto (*B. pilosa*), o extrato de 55 °C causou ausência de germinação, enquanto o extrato de 85 °C a inibiu em aproximadamente 70%. As sementes de alface (*L. sativa*) apresentaram ausência de germinação após tratamento com ambos os extratos. Para todas as espécies utilizadas, o extrato de

55 °C causou anormalidades mais acentuadas, sendo as principais: radícula e parte aérea encurtadas e em alguns casos coloração amarronzada na radícula.

A análise do mesmo experimento a partir da metodologia descrita pela OCDE indicou que os extratos não causaram efeito sobre a germinação de cebola e alface. No entanto, foi observado que de 84% a 90% das plântulas apresentaram anormalidades, sem diferença significativa entre os extratos. Por outro lado, os extratos causaram inibição da germinação e propiciaram de 62% a 73% de plântulas anormais de picão-preto. Portanto, os extratos da polpa do fruto da erva-mate exerceram maior impacto sobre a germinação das sementes de picão-preto quando avaliado pelo método OCDE e sobre alface utilizando método RAS.

Quanto a inibição ou estímulo do crescimento da parte aérea de cebola e picão-preto, ambos os extratos causaram inibição, sendo que para picão-preto, esse resultado foi mais significativo com extrato de 55 °C. Para alface, o extrato de 55 °C causou inibição do crescimento da parte aérea em 18% e o extrato de 85 °C apresentou medida de parte aérea semelhante ao grupo controle.

A atividade alelopática observada pode estar relacionada ao sinergismo dos compostos presentes no extrato. Destacam-se os compostos fenólicos, abordados nesse trabalho. No entanto, diante das anormalidades mais acentuadas observadas nas plântulas tratadas com o extrato de 55 °C, destaca-se também a toxicidade das saponinas, uma vez que essa temperatura é indicada para extração desses compostos com maior rendimento.

Foi observado que a aplicação do extrato da polpa do fruto da erva-mate como bioherbicida é promissora. Estudos prospectivos são necessários para que o potencial alelopático seja relacionado a compostos específicos e para que esse subproduto seja aproveitado de forma sustentável. Além disso, testes de germinação e emergência em solo estão em desenvolvimento para avaliar a relação das anormalidades das plântulas com o seu potencial de desenvolvimento. A temperatura de extração de 85 °C foi escolhida para esses testes, uma vez que o extrato obtido nessa temperatura inibiu a germinação e crescimento da parte aérea do picão-preto e não causou efeito negativo sobre o crescimento da parte aérea da alface.

REFERÊNCIAS

- ALIKARIDIS, F. Natural constituents of *Ilex* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, n. 2, p. 121–144, 1987.
- ALVES, R. J. V. et al. The evaluation of maté (*Ilex paraguariensis*) genetic toxicity in human lymphocytes by the cytokinesis-block in the micronucleus assay. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 695–698, 2008.
- ANJUM, T.; BAJWA, R. Importance of germination indices in interpretation of allelochemical effects. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 7, n. 3, p. 417–419, 2005.
- ARAÚJO, A. A. S. et al. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 269–277, 2006.
- BAISCH, A. L. M.; URBAN, H.; RUIZ, A. N. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of lyophilized seeds of *Casimiroa edulis* (AECe) on rat mesenteric arterial bed. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2–3, p. 163–167, 2004.
- BARBOSA, J. Z. et al. Composition, Hot-Water Solubility of Elements and Nutritional Value of Fruits and Leaves of Yerba Mate. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 39, n. 6, p. 593–603, 2015.
- BARRAL, M. T.; PARADELO, R. A Review on the Use of Phytotoxicity as a Compost Quality Indicator. **Dynamic Soil, Dynamic Plant**, v. 5, n. 2, p. 36–44, 2011.
- BASTOS, D. H. M. et al. Bioactive compounds content of chimarrão infusions related to the moisture of yerba maté (*Ilex paraguariensis*) leaves. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n. 3, p. 399–404, 2006.
- BATISH, D. R. et al. Allelopathic effects of parthenin against two weedy species, *Avena fatua* and *Bidens pilosa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 47, n. 2, p. 149–155, 2002.
- BATTACHARYYA, D. et al. Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, v. 196, p. 39–48, 2015.
- BERTÉ, K. A. S. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Yerba-Mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae) Extract as Obtained by Spray Drying. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 10, p. 5523–5527, 2011.
- BORRÉ, G. L. et al. Comparison of methylxanthine, phenolics and saponin contents in leaves, branches and unripe fruits from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate). **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 33, n. 3, p. 362–374, 2010.
- BRASIL. **Lei nº 10.711 de 5 de agosto de 2003**. Dispõe sobre o Sistema Nacional

de Sementes e Mudas e dá outras providências., Brasília, 5 de agosto de 2003. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/2003/L10.711.htm>. Acesso em: 5 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde e Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial da União nº 184, RDC nº 277 de 22 de setembro de 2005**. Regulamento Técnico para Café, Cevada, Chá, Erva-mate e Produtos Solúveis, Brasília, 23 de setembro de 2005. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/resolucao-rdc-no-267-de-22-de-setembro-de-2005.pdf>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Farmacopéia brasileira 5^a edição. **Diário Oficial da União nº 224**, Brasília, 23 de novembro de 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Farmacopéia brasileira 6^a edição. **Diário Oficial da União nº 156**, Brasília, 14 de agosto de 2019.

BRASIL. **Decreto nº 7.794, de 20 agosto de 2012**. Institui a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica, Brasília, 20 de agosto de 2012. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/decreto/d7794.htm>. Acesso em: 5 ago. 2019.

BRASIL. **Lei nº 12.805 de 29 de abril de 2013**. Institui a Política Nacional de Integração Lavoura-Pecuária-Floresta e altera a Lei nº 8.171 de 17 de janeiro de 1991, Brasília, 29 de abril de 2013. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2011-2014/2013/Lei/L12805.htm>. Acesso em: 5 ago. 2019.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da extração vegetal e silvicultura**, 2018. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/289>> Acesso em: 28 abr. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf>. Acesso em: 4 ago. 2019.

BRESSAN, R. T. et al. Influence of *Ilex paraguariensis* aqueous extract on safflower growth and germination in vitro. **African Journal of Agricultural Research**, v. 11, n. 40, p. 4021–4026, 2016.

BRITO, F. C.; GOSMANN, G.; OLIVEIRA, G. T. Extracts of the unripe fruit of *Ilex paraguariensis* as a potential chemical control against the golden apple snail *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Ampullariidae). **Natural Product Research**, p. 1-4, 2018.

BRITO, F. C. et al. **Estágios de maturação dos frutos de erva-mate, *Ilex paraguariensis***. Colombo: Embrapa, 2018. Comunicado Técnico nº 433. Disponível

em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1109008>>. Acesso em: 4 ago. 2019.

BULGARI, R. et al. Biostimulants and crop responses: A review. **Biological Agriculture and Horticulture**, v. 31, n. 1, p. 1–17, 2015.

BURRIS, K. P. et al. Antimicrobial Activity of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) Aqueous Extracts against *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. 456–462, 2011.

CANSIAN, R. L. et al. Semi-volatile compounds variation among Brazilian populations of *Ilex paraguariensis* St. Hil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 1, p. 175–181, 2008.

CANTO, G. S. **Avaliação físico-química e tecnológica da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: potencialidade como adjuvante espumógeno**. 201 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

CARDOZO JR, E. L. et al. Methylxanthines and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies grown in Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, n. 7, p. 553–558, 2007.

CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2383–2389, 2010.

CHÁVEZ-SANTOSCOY, R. A. et al. Production of maize tortillas and cookies from nixtamalized flour enriched with anthocyanins, flavonoids and saponins extracted from black bean (*Phaseolus vulgaris*) seed coats. **Food Chemistry**, v. 192, p. 90–97, 2016.

CHEOK, C. Y.; SALMAN, H. A. K.; SULAIMAN, R. Extraction and quantification of saponins: A review. **Food Research International**, v. 59, p. 16–40, 2014.

CLIFFORD, M. N.; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents of Maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 13–21, 1990.

COELHO, G. C. **Teores de metilxantinas e saponinas e morfologia foliar de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) sob a influência de diferentes fatores ambientais e em diferentes variedades e populações**. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

CORREIA, L. P. et al. Characterization of herbal medicine with different particle sizes using pyrolysis GC/MS, SEM, and thermal techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 111, n. 3, p. 1691–1698, 2013.

COSTA, R. S. et al. Investigation of thermal behavior of *Heliotropium indicum* L. lyophilized extract by TG and DSC. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**,

v. 111, p. 1959–1964, 2013.

CRUZ, R. A. et al. Target and Non-target Site Mechanisms Developed by Glyphosate-Resistant Hairy beggarticks (*Bidens pilosa* L.) Populations from Mexico. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

DERMECHE, S. et al. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. **Process Biochemistry**, v. 48, p. 1532–1552, 2013.

DMITROVIĆ, S. et al. Hairy root exudates of allelopathic weed *Chenopodium murale* L. induce oxidative stress and down-regulate core cell cycle genes in *Arabidopsis* and wheat seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 75, p. 365–382, 2015.

DUDAI, N., et al. Essential Oils as Allelochemicals and their Potential Use as Bioherbicides. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 5, p. 1079–1089, 1999.

DUKE, S. O. et al. Chemicals from nature for weed management. **Weed Science**, v. 50, n. 2, p. 138–151, 2002.

ESMELINDRO, M. C. et al. Caracterização físico-química da erva mate: influência das etapas do processamento industrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 193–204, 2002.

FAROOQ, M. et al. Application of allelopathy in crop production. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 15, n. 6, p. 1367–1378, 2013.

FERNANDES, F. H. A. et al. Thermal characterization of dried extract of medicinal plant by DSC and analytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, n. 2, p. 443–447, 2013.

FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and hypolipemiant potential of *Ilex paraguariensis* fruit extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 81, p. 139–146, 2016.

FERNANDES, C. E. F. et al. Phytochemical profile, antioxidant and antimicrobial activity of extracts obtained from erva-mate (*Ilex paraguariensis*) fruit using compressed propane and supercritical CO₂. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 1, p. 98–104, 2017.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Allelopathy: an Emerging Topic in Ecophysiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, Edição Especial, p. 175–204, 2000.

FILHO, U. D. **Introdução à Bioestatística**: Para simples mortais. São Paulo: Elsevier, 1999.

FILIP, R. et al. Mate Substitutes or Adulterants: Study of Xanthine Content. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. 2, p. 129–131, 1998.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species.

Nutrition Research, v. 20, n. 10, p. 1437–1446, 2000.

FILIP, R. et al. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. **Fitoterapia**, v. 72, n. 7, p. 774–778, 2001.

GAALICHE, B. et al. Relationship between phytochemical profiles and phytotoxic proprieties of Tunisian fig leaf cultivars. **South African Journal of Botany**, v. 112, p. 322–328, 2017.

GIÃO, M. S. et al. Effect of particle size upon the extent of extraction of antioxidant power from the plants *Agrimonia eupatoria*, *Salvia* sp. and *Satureja montana*. **Food Chemistry**, v. 117, p. 412–416, 2009.

GONDA, S. et al. Effect of high relative humidity on dried *Plantago lanceolata* L. leaves during long-term storage: Effects on chemical composition, colour and microbiological quality. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 1, p. 88–93, 2012.

GONZÁLEZ, A. et al. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 3, p. 217–220, 1993.

GORZALCZANY, S. et al. Choleric effect and intestinal propulsion of “mate” (*Ilex paraguariensis*) and its substitutes or adulterants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, n. 2–3, p. 291–294, 2001.

GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P.; SELIGNMANN, O. A new saponin from mate, *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 6, p. 1367–1370, 1989.

GOSMANN, G. et al. Triterpenoid saponins from *Ilex paraguariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 3, p. 438–441, 1995.

GUGLIUCCI, A.; MENINI, T. The botanical extracts of *Achyrocline satureioides* and *Ilex paraguariensis* prevent methylglyoxal-induced inhibition of plasminogen and antithrombin III. **Life Sciences**, v. 72, n. 3, p. 279–292, 2002.

HAO, W. et al. Control of citrus postharvest green and blue mold and sour rot by tea saponin combined with imazalil and prochloraz. **Postharvest Biology and Technology**, v. 56, p. 39–43, 2010.

HAYAT, S. et al. Aqueous garlic extract stimulates growth and antioxidant enzymes activity of tomato (*Solanum lycopersicum*). **Scientia Horticulturae**, v. 240, p. 139–146, 2018.

HAZRA, A. et al. Characterization of some essential oils and their key components: thermoanalytical techniques. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 75, n. 1, p. 317–330, 2004.

HEAP. **International Survey of Herbicide Resistant Weeds**. Herbicide Resistant Hairy Beggarticks Globally (*Bidens pilosa*). Disponível em: <<http://www.weedscience.org/Summary/Species.aspx?WeedID=32>>. Acesso em: 05 ago. 2019.

IONASHIRO, M.; CAIRES, F.J.; GOMES, D.J.C. **Giolito: Fundamentos da Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial / Calorimetria Exploratória Diferencial**. São Paulo: Esper, 2014.

ISOLABELLA, S. et al. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, n. 3, p. 695–699, 2010.

JITAREANU, A. et al. Toxicity of some cinnamic acid derivatives to common bean (*Phaseolus vulgaris*). **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 39, n. 2, p. 130–134, 2011.

KASSUIA, Y. S. et al. **Método Prático e Rápido para Estimar a Quantidade de Saponinas em Extratos de Polpa de Frutos da Erva-Mate**. Embrapa, 2019. Comunicado Técnico. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1111582>>. Acesso em: 19 set. 2019.

KATASHIMA, C. K. et al. Ursolic acid and mechanisms of actions on adipose and muscle tissue: a systematic review. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 6, p. 700–711, 2017.

KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 4, p. 412–422, 2011.

KIM, H. K. et al. Metabolic classification of South American *Ilex* species by NMR-based metabolomics. **Phytochemistry**, v. 71, n. 7, p. 773–784, 2010.

KOODKAEW, I. et al. Characterization of phytochemical profile and phytotoxic activity of *Mimosa pigra* L. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, p. 162–168, 2018.

KRAEMER, K. H. et al. Matesaponin 5, a highly polar saponin from *Ilex paraguariensis*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1119–1122, 1996.

KUNIYOSHI, Y. S. **Morfologia da Semente e da Germinação de 25 Espécies Arbóreas de uma Floresta com Araucaria**. 1983. 245 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1983. Disponível em: <<https://www.acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/25193/d%20-%20kuniyoshi,%20yoshiko%20saito.pdf?sequence=1>> Acesso em: 4 ago. 2019.

LI, Z. H. et al. Phenolics and plant allelopathy. **Molecules**, v. 15, p. 8933–8952, 2010.

LISA, G. et al. Thermal and thermo-oxidative stability and probable degradation mechanism of some polyetherimides. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 118, p. 144–154, 2016.

LIU, K. Effects of sample size, dry ashing temperature and duration on determination

of ash content in algae and other biomass. **Algal Research**, v. 40, 2019.

LOVAGLIO, T. et al. Compositions of compounds extracted from thermo-treated wood using solvents of different polarities. **IForest**, v. 10, p. 824–828, 2017.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512–2521, 2000.

MACÍAS, F. A. et al. Allelopathy - a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, p. 327–348, 2007.

MALUCELLI, L. C. et al. Thermal and chemical characterization of *Dicksonia sellowiana* extract by means of thermal analysis. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 28, p. 626–630, 2018.

MANEN, J. F.; BOULTER, M. C.; NACIRI-GRAVEN, Y. The complex history of the genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae): Evidence from the comparison of plastid and nuclear DNA sequences and from fossil data. **Plant Systematics and Evolution**, v. 235, n. 1–4, p. 79–98, 2002.

MARCHAIM, U.; WERKER, E.; THOMAS, W. D. E. Changes in the anatomy of cotton seed coats caused by *Lucerne* saponins. **Botanical Gazette**, v. 135, n. 2, p. 139–146, 1974.

MAZUCHOWSKI, J.Z. **Manual da erva-mate**. Curitiba: EMATER-PR, 1989.

MESNAGE, R. et al. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p. 133–153, 2015.

MIRÓ, C. P.; FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia de frutos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 33, n. 8, p. 1261–1270, 1998.

MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316–8324, 2009.

MOSIMANN, A. L. P.; WILHELM-FILHO, D.; SILVA, E. L. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* attenuates the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **BioFactors**, v. 26, n. 1, p. 59–70, 2006.

MÜLLER, V. et al. Evaluation of antiviral activity of South American plant extracts against herpes simplex virus type 1 and rabies virus. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 970–974, 2007.

NGUYEN, T. L.; LE, T. N.; MEBEL, A. M. Thermochemistry of cyclopentadienylidene ($c\text{-C}_5\text{H}_4$, C_{2v} , 3B_1), cyclopentadienyl radical ($c\text{-C}_5\text{H}_5$, C_{2v} , 2B_1) and 1,3-

cyclopentadiene (c-C₅H₆, C_{2v}, ¹A₁): a theoretical study by the G2M(RCC,MP2) method. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 14, p. 131-138, 2001.

NUNES, G. L. et al. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60–68, 2015.

OLESZEK, W.; BIALY, Z. Chromatographic determination of plant saponins - An update (2002-2005). **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 78–91, 2006.

OLIVEIRA, G. T. et al. Allelopathic effect of the ethanol extract and fractions of the aerial parts of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Natural Product Research**, v. 33, n. 16, p. 2402–2407, 2019.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO. **OECD 208**: Guidelines for the Testing of Chemicals - Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1787/9789264070066-en>> Acesso em: 04 ago. 2019.

PANG, J.; CHOI, Y.; PARK, T. *Ilex paraguariensis* extract ameliorates obesity induced by high-fat diet: Potential role of AMPK in the visceral adipose tissue. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, n. 2, p. 178–185, 2008.

PAVEI, C. et al. Development and validation of an HPLC method for the characterization and assay of the saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (mate) fruits. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**, v. 30, n. 1, p. 87–95, 2007.

PEDROSO, G. L. et al. Efeito do extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* sobre o metabolismo de ratos machos. **Clinical and Biomedical Research**, v. 30, n. 3, p. 241–246, 2010.

PEIXOTO, M. P. G. **Saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate)**: desenvolvimento de metodologia analítica, estudos físico-químico e biológico. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PEIXOTO, M. P. G. et al. LC-UV assay method and UPLC/Q-TOF-MS characterisation of saponins from *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Mate) unripe fruits. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 415–420, 2012.

PEREIRA, C. K. B. et al. Allelopathic effects of *Cecropia pachystachya* Trecul on germination and seedling growth of *Lactuca sativa*. **Allelopathy Journal**, v. 42, n. 2, p. 263–278, 2017.

PEREIRA, W. **Manejo de plantas daninhas em hortaliças**. EMBRAPA/Centro nacional de pesquisa de hortaliças, 1987. Circular Técnica. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/107331/1/CNPH-DOCUMENTOS-04-MANEJO-DE-PLANTAS-DANINHAS-EM-HORTALICAS-FL-07813.pdf>>. Acesso em: 04 ago. 2019.

PINHO, I. A. et al. Phytotoxicity assessment of olive mill solid wastes and the influence of phenolic compounds. **Chemosphere**, v. 185, p. 258–267, 2017.

POMILIO, A. B.; TRAJTEMBERG, S.; VITALE, A. A. High-performance capillary electrophoresis analysis of mate infusions prepared from stems and leaves of *Ilex paraguariensis* using automated micellar electrokinetic capillary chromatography. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 4, p. 235–241, 2002.

POPA, V. I. et al. Lignin and polyphenols as allelochemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 27, n. 2, p. 144–149, 2008.

PUTNAM, A. R.; DUKE, W. B. Biological suppression of weeds: evidence for allelopathy in accessions of cucumber. **Science**, v. 185, n. 4148, p. 370–2, 1974.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 554, n. 1, p. 53–65, 2004.

RELYEA, R. A. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, v. 15, n. 2, p. 618–627, 2005.

RIZVI, S. J. H.; RIZVI, V. **Allelopathy: Basic and applied aspects**. 1^o ed. Chapman e Hall, 1992.

ROSA, S. D. V. F. et al. Inibição do desenvolvimento in vitro de embriões de *Coffea* por cafeína exógena. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 177–184, 2006.

SANTOS, J. B.; CURY, J. P. Picão-Preto uma Planta Daninha Especial em Solos Tropicais. **Planta Daninha**, v. 29, p. 1159–1171, 2011.

SARI, F.; VELIOGLU, Y. S. Effects of particle size, extraction time and temperature, and derivatization time on determination of theanine in tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, p. 1130–1135, 2011.

SCHUBERT, A. et al. Comparison of antioxidant activities and total polyphenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. **Pharmazie**, v. 62, n. 11, p. 876–880, 2007.

SHARMA, K. et al. Temperature-dependent studies on the total phenolics, flavonoids, antioxidant activities, and sugar content in six onion varieties. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, p. 243–252, 2015.

SILVA, R. M. G. et al. Allelopathic effect of the peel of coffee fruit. **Scientia Horticulturae**, v. 158, p. 39–44, 2013.

SILVA, E. R.; OVERBECK, G. E.; SOARES, G. L. G. Phytotoxicity of volatiles from fresh and dry leaves of two Asteraceae shrubs: Evaluation of seasonal effects.

South African Journal of Botany, v. 93, p. 14–18, 2014.

SILVA, C. G. F. **Estudo de técnicas de extração de saponinas do fruto de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill)**. 2016. 99 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Setor de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016. Disponível em: <<https://lume.ufrgs.br/handle/10183/142649>>. Acesso em: 04 ago. 2019.

SILVEIRA, A. C. et al. **Método de DPPH adaptado: uma ferramenta para analisar atividade antioxidante de polpa de frutos da erva-mate de forma rápida e reprodutível**. Embrapa, 2018. Comunicado Técnico. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1101294>>. Acesso em: 5 ago. 2019.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. LTC, 7 ed, 2007.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2000.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos para Determinação da Atividade Antioxidantes em Frutos. **UNOPAR Científica**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2012.

TABARAKI, R.; HEIDARIZADI, E.; BENVIDI, A. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum* L.) peel antioxidants by response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, v. 98, p. 16–23, 2012.

TAKETA, A. T. C.; BREITMAIER, E.; SCHENKEL, E. P. Triterpenes and triterpenoidal glycosides from the fruits of *Ilex paraguariensis* (Maté). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 2, p. 205–211, 2004.

TANTI, A. et al. Allelopathic potential of caffeine as growth and germination inhibitor to popular tea weed, *Borreria hispida* L. **Current Life Sciences**, v. 2, n. 4, p. 114–117, 2016.

TRETER, J. et al. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Ilex paraguariensis* (“mate”) fruits. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 6, p. 914–918, 2010.

TSAI, T. H. et al. In vitro antimicrobial and anti-inflammatory effects of herbs against *Propionibacterium acnes*. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 964–968, 2010.

TURNER, S. et al. Evaluation of the Antioxidant Activity and Polyphenols Content of *Ilex paraguariensis* (Mate) During Industrialization. **Advanced Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 23–30, 2011.

TURNES, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e alelopática do extrato etanólico e frações das cascas do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam., Rutaceae. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 35, n. 3, p. 459–467, 2014.

UDDIN, M. B. et al. Inhibitory effects of *Albizia lebbeck* leaf extracts on germination and growth behavior of some popular agricultural crops. **Journal of Forestry Research**, v. 18, n. 2, p. 128–132, 2007.

VONGSANGNAK, W. et al. Towards efficient extraction of notoginseng saponins from cultured cells of *Panax notoginseng*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, p. 115–120, 2004.

WALLER, G. R. et al. Saponins produced during the life cycle of mungbeans and their role as allelochemicals. **Studies in Plant Science**, v. 6, p. 105–130, 1999.

WALLER, G. R.; YAMASAKI, K. **Saponins used in food and agriculture**. Nova York e Londres: Plenum Press, 1996.

WOLFF, S. M.; SILVEIRA, A. C.; LAZZAROTTO, M. Metodologia para Extração de Fenólicos Totais e Antioxidantes da Erva-Mate. **Iniciação Científica CESUMAR**, v. 21, n. 1, p. 45-54, 2019.

XUAN, T. D. et al. Allelopathic potential of sweet potato varieties to control weeds: *Imperata cylindrica*, *Bidens pilosa* and *Ageratum conyzoides*. **Allelopathy Journal**, v. 38, n. 1, p. 41–54, 2016.

YOON, K. R.; WROLSTAD, R. E. Investigation of Marion Blackberry, Strawberry, and Plum Fruit for the Presence of Saponins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 32, p. 691–693, 1984.

ZANON, A. **Produção de Sementes de Erva-mate**. Curitiba: Embrapa, 1988. Circular Técnica nº 16. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/16957/1/circ-tec16.pdf>>. Acesso em: 4 ago. 2019.

ZAR, J. H. **Biostatistical Analysis**. New Jersey: Prentice Hall, 4 ed, 1999.

ZEFERINO, I.; LIMA, E. A.; VIEIRA, E. S. N. **Uso do extrato pirolenhoso como adjuvante de herbicida**. Colombo: Embrapa, 2018. Comunicado Técnico nº 429. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/191243/1/CT-429-1660-final2.pdf>>. Acesso em: 4 ago. 2019.